

Fachbereich Biologie
-Mikrobiologie-
Philipps-Universität Marburg



**Regulation der Aufnahme und Synthese des kompatiblen
Soluts Glycinbetain durch GbsR-Typ Regulatoren**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt von
Bianca Warmbold
aus Hannover

Marburg/Lahn, 2019

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2015 bis Dezember 2018 im Laboratorium für Mikrobiologie am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Erhard Bremer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen
am: 02.05.2019

Gutachter dieser Dissertation waren:

Erstgutachter: Prof. Dr. Erhard Bremer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Gert Bange

Tag der mündlichen Prüfung: 07.06.2019

In Zusammenhang mit der vorliegenden Dissertation wurden folgende Publikationen veröffentlicht:

Hoffmann T.*, **Warmbold B.***, Smits S.*, Tschapek B., Ronzheimer S., Bashir A., Chen C., Rolbetzki A., Pittelkow M., Jebbar M., Seubert A., Schmitt L., Bremer E. (2018) Arsenobetaine: an ecophysiologically important organoarsenical confers cytoprotection against osmotic stress und growth temperature extremes. *Env. Microbiol.* 20:305-323.

** Gleichberechtigte Erstautorenschaft*

Teichmann L., Kümmel H., **Warmbold B.**, Bremer E. (2018) OpuF: a new *Bacillus* compatible solute ABC-Transporter with a substrate-binding protein fused to the trans-membrane domain. *Appl. Env. Microbiol.* 84:e01728-18.

Ronzheimer S.*, **Warmbold B.***, Arnhold C., Bremer E. (2018) The GbsR family of transcriptional regulators: functional characterization of the OpuAR repressor. *Front. Microbiol.* 9:2536.

**Gleichberechtigte Erstautorenschaft*

*Gegen Zielsetzungen ist nichts einzuwenden, sofern man sich nicht von
interessanten Umwegen abhalten lässt.*

- Mark Twain -

Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung.....	1
II.	Summary.....	2
II .	Einleitung	3
1	Antwort auf osmotischen Stress	3
1.1	Kompatible Solute	4
1.2	Aufnahme von kompatiblen Soluten in <i>B. subtilis</i>	4
1.3	Synthese von Glycinbetain	6
2	Der MarR-Typ Regulator GbsR	9
2.1	Regulation der Glycinbetain Synthese durch den MarR-Typ Repressor GbsR in <i>B. subtilis</i>	10
2.2	Verwandte Regulatoren des GbsR Repressors	13
3	Osmoprotektion in dem marinen Bakterium <i>Bacillus infantis</i>	16
III.	Zielsetzung.....	17
IV.	Material und Methoden.....	18
4	Chemikalien und Materialien	18
5	Bakterienstämme, Plasmide und Oligonucleotide.....	18
6	Mikrobiologische Methoden	26
6.1	Medien	26
6.1.1	Medienzusätze	27
6.1.2	Kompatible Solute.....	27
6.2	Sterilisation	27
6.3	Wachstumsbedingungen und Kultivierung von Bakterien	28
6.4	Ermittlung der Zelldichte.....	28
7	Molekularbiologische Methoden	28
7.1	Präparation von Nucleinsäuren	28
7.1.1	Präparation von genomischer DNA aus <i>B. subtilis</i>	28
7.1.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	28
7.2	Konzentrationsbestimmung von DNA	29
7.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	29
7.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	29
7.5	Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation von DNA	29
7.6	Reinigung und Fällung von DNA	30
7.7	Zielgerichtete Mutagenese	30
7.8	Sequenzierung von DNA.....	30
7.9	Transformation von <i>E.coli</i> und <i>B. subtilis</i>	30
7.9.1	Transformation von <i>E. coli</i>	30

7.9.2	Transformation von <i>B. subtilis</i>	31
8	Biochemische Methoden	32
8.1	Nachweis der Amylase-Aktivität	32
8.2	Bestimmung der TreA-Aktivität.....	32
8.3	¹³ C-Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)	33
8.4	Bestimmung von intrazellulären Solut-Pools.....	33
8.5	Produktion und Reinigung von rekombinanten Proteinen	34
8.5.1	Heterologe Expression von Proteinen.....	34
8.5.2	Proteinreinigung via Strep-Tag® Affinitätschromatographie.....	34
8.5.3	Gelfiltration	35
8.5.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
8.5.5	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	36
8.6	Pufferscreen zur Stabilisierung des Proteins GbsR	36
8.7	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	37
9	Bioinformatik	37
V.	Ergebnisse	38
10	Phylogenetische Verbreitung der Opu-Transporter und der Glycinbetain Synthese aus Cholin.....	38
11	Intrazelluläre Akkumulation von Glycinbetain durch Aufnahme und Synthese	41
12	GbsR – Regulator der Glycinbetain Synthese	42
12.1	Analyse der oligomeren Struktur des GbsR Proteins.....	42
12.2	Analyse des DNA-Bindemotivs von GbsR	44
12.2.1	Analyse des DNA-Bindemotivs von GbsR in der regulatorischen Region des <i>gbsAB</i> Operons.....	44
12.2.2	Analyse des DNA-Bindemotivs von GbsR in der regulatorischen Region des <i>opuB</i> Operons	46
12.3	Analyse der Cholin-Bindetasche des GbsR Proteins	49
12.3.1	Mutagenesestudie der putativen Cholin-Bindetasche des GbsR Proteins	51
12.3.2	GbsR Varianten, die die Cholin-Bindung beeinflussen zeigen einen dominant-negativen Phänotyp.....	54
12.3.3	Analyse der strukturellen Integrität der GbsR Varianten	55
13	GbsR-Typ Proteine als Sub-Gruppe der MarR-Familie transkriptioneller Regulatoren...58	
13.1	Phylogenetische Verbreitung von GbsR-Typ Regulatoren.....	58
13.2	GbsR-Typ Regulatoren die mit Cytochrom <i>bd</i> Sauerstoff Reduktasen assoziiert sind	60
13.3	GbsR-Typ Regulatoren die mit der Synthese von Glycinbetain assoziiert sind	62
13.4	GbsR-Typ Regulatoren die mit Aufnahmesystemen für kompatible Solute assoziiert sind.....	65
13.5	Analyse der Verwandtschaft von GbsR-Typ Proteinen	66

14	Regulation des <i>opuA</i> Genclusters aus <i>B. infantis</i> NRRL B-14911	68
14.1	Expression der <i>opuA</i> Gene in Abhängigkeit von hohen Salinitäten	68
14.2	Expression der <i>opuA</i> Gene in Abhängigkeit von kompatiblen Soluten.....	69
14.3	Das OpuAR Protein aus <i>B. infantis</i>	70
15	Regulation der verwandten Gencluster <i>opuB</i> und <i>opuC</i> in <i>B. subtilis</i>	73
15.1	Expression des <i>opuB</i> und <i>opuC</i> Operons in Abhängigkeit von der extrazellulären Osmolarität	73
15.2	Transkriptionelle Kontrolle der <i>opuB</i> und <i>opuC</i> Operone durch GbsR-Typ Regulatoren	75
16	OpcR – Hochsalz-Repressor der <i>opuC</i> Expression	78
16.1	Autoregulation der <i>opcR</i> Expression	81
16.2	Analyse der Struktur des OpcR Repressors	82
17	RemA – Verknüpfung zwischen der Antwort auf osmotischen Stress und Biofilmbildung	83
18	Synthese des kompatiblen Soluts Arsenobetain aus dem Vorläufer Arsenocholin.....	86
18.1	Die osmoprotektive Wirkung von Arsenobetain in <i>B. subtilis</i>	87
18.2	Regulation der <i>gbsAB</i> Expression in Antwort auf Arsenocholin und Arsenobetain ..	90
VI.	Diskussion und Ausblick.....	92
19	GbsR-Typ Regulatoren – Eine neue Sub-Familie der MarR-Superfamilie.....	92
19.1	Ligandenbindung durch GbsR-Typ Regulatoren.....	93
19.2	DNA-Bindung durch GbsR-Typ Regulatoren	97
20	Das Zusammenspiel zweier GbsR-Typ Regulatoren und eines Aktivators reguliert die Aufnahme und Synthese von kompatiblen Soluten in <i>B. subtilis</i>	100
20.1	Transkriptionelle Kontrolle der ABC-Transporter OpuB und OpuC	102
20.2	OpcR – Hochsalzrepressor der <i>opuC</i> Expression	103
21	Die Synthese des Osmolyts Arsenobetain in <i>B. subtilis</i>	104
22	OpuA aus <i>B. infantis</i> – Ein substratinduzierter Transporter für kompatible Solute	105
22.1	RemA stellt eine Verbindung zwischen der Osmoprotektion und der Biofilmbildung in <i>B. subtilis</i> dar	107
VII.	Literaturverzeichnis	110
VIII.	Anhang.....	126
IX.	Danksagung	137
X.	Erklärung.....	1388

Abbildung 1 Substratspektrum der Opu-Transporter in <i>B. subtilis</i>	5
Abbildung 2 Unterschiedliche Wege der Glycinbetain Synthese in Mikroorganismen.	8
Abbildung 3 Regulation der Glycinbetain Synthese in <i>B. subtilis</i> durch den MarR-Typ Regulator GbsR.	11
Abbildung 4 <i>In silico</i> Model des GbsR Proteins aus <i>B. subtilis</i>	12
Abbildung 5 Gencluster der Glycinbetain Synthese aus <i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Halobacillus dabanensis</i> und <i>Halobacillus halophilus</i>	13
Abbildung 6 Genetische Organisation der Gencluster <i>opuB</i> und <i>opuC</i> in <i>B. subtilis</i>	14
Abbildung 7 Phylogenetische Verbreitung der Opu-Transporter, sowie der Enzyme GbsAB des Glycinbetain Synthesewegs.	39
Abbildung 8 Intrazelluläre Pools von Glycinbetain und Cholin in <i>B. subtilis</i> unter osmotischem Stress.	42
Abbildung 9 Größenausschlusschromatographie des GbsR Proteins aus <i>B. subtilis</i> und seine Analyse mittels SDS-Gel.	43
Abbildung 10 Die GbsR-Bindestelle innerhalb der Promotorregion des <i>gbsAB</i> Operons.....	45
Abbildung 11 Analyse der GbsR-Bindestelle innerhalb der regulatorischen Region des <i>gbsAB</i> Operons.....	46
Abbildung 12 Die GbsR-Bindestellen in den regulatorischen Regionen des <i>gbsAB</i> und <i>opuB</i> Operons.	47
Abbildung 13 Sequenzvergleich der <i>opuB</i> Promotorregionen innerhalb der Gattung <i>Bacillus</i>	47
Abbildung 14 Vergleich der Cholin-Bindetaschen der Substratbindeproteine OpuBC, OpuCC und ChoX mit GbsR.	50
Abbildung 15 Analyse der putativen Ligandenbindetasche des Regulators GbsR.....	53
Abbildung 16 Dominant-negativer Phänotyp von GbsR Varianten.....	55
Abbildung 17 Analyse der Löslichkeit der GbsR Varianten GbsR ¹⁰⁷ W/R und GbsR ¹⁰³ F/R. ...	56
Abbildung 18 Größenausschlusschromatographie der GbsR Varianten GbsR ⁹⁴ F/A und GbsR ⁹⁶ F/K.....	57
Abbildung 19 Phylogenetische Verteilung von GbsR-Typ Regulatoren in <i>Archaea</i> und <i>Bacteria</i>	59
Abbildung 20 Genetische Organisation von <i>gbsR</i> -verwandten Genen die zusammen mit Genen für Cytochrom <i>bd</i> -Typ Sauerstoff Reduktasen vorliegen.	61
Abbildung 21 Genetische Organisation von <i>gbsR</i> -verwandten Genen die zusammen mit Genen für die Synthese von Glycinbetain vorliegen.	62

Abbildung 22 <i>In silico</i> Modelle der GbsU Substratbindeproteine.....	64
Abbildung 23 Genetische Organisation von <i>gbsR</i> -Typ Genen, die mit Transportern des OpuA-, OpuB- und OpuC-Typs assoziiert sind.....	65
Abbildung 24 Kladogramm der GbsR-Typ Proteine der <i>Bacteria</i> und <i>Archaea</i>	67
Abbildung 25 Salzinduktion der <i>opuA</i> Expression.....	69
Abbildung 26 Substratinduktion der <i>opuA</i> Expression.	70
Abbildung 27 <i>In silico</i> Model des OpuAR Proteins aus <i>B. infantis</i>	71
Abbildung 28 Größenausschlusschromatographie des OpuAR Proteins aus <i>B. infantis</i> und seine Analyse mittels SDS-Gel.	72
Abbildung 29 Expression von <i>opuB</i> und <i>opuC</i> in Abhängigkeit von unterschiedlichen extrazellulären Salinitäten.	74
Abbildung 30 Osmotische Induktion der <i>opuB</i> und <i>opuC</i> Transkription.	75
Abbildung 31 DNA Bindestellen der Regulatoren GbsR und OpcR.	76
Abbildung 32 Regulation der <i>opuB</i> Expression durch die GbsR-Typ Regulatoren GbsR, OpcR und Yvav.....	77
Abbildung 33 Regulation der <i>opuC</i> Expression durch die GbsR-Typ Regulatoren GbsR, OpcR und Yvav.....	78
Abbildung 34 OpcR-abhängige Repression der <i>opuC</i> Expression unter hochosmolaren Bedingungen.	79
Abbildung 35 Expression von <i>opcR</i> in Abhängigkeit von extrazellulären Osmolyten.....	80
Abbildung 36 Autoregulation der <i>opcR</i> Expression.....	81
Abbildung 37 Größenausschlusschromatographie und <i>in silico</i> Model des OpcR Proteins aus <i>B. subtilis</i>	82
Abbildung 38 Regulation der <i>opuB</i> Expression durch den Biofilm Aktivator RemA.....	84
Abbildung 39 Regulation der <i>opuC</i> Expression durch den den Aktivator RemA.....	85
Abbildung 40 Aktivierung der <i>opcR</i> Expression durch RemA.	85
Abbildung 41 Strukturformeln von Glycinbetain und Arsenobetain.	86
Abbildung 42 Qualitative Identifizierung von Glycinbetain, Arsenobetain, Cholin und Arsenocholin durch ¹³ C-NMR Spektren.	88
Abbildung 43 Intrazelluläre Akkumulation von Glycinbetain, Arsenobetain, Cholin und Arsenocholin in Antwort auf hohe Salinitäten.....	89

Abbildung 44 GbsR-abhängige Kontrolle der <i>gbsAB</i> Expression in Gegenwart von Cholin, Arsenocholin, Glycinbetain und Arsenobetain.	91
Abbildung 45 Kristalle der GbsR-Typ Proteine GbsR, OpuAR und OpcR.....	97
Abbildung 46 DNA-Bindestellen der GbsR-Typ Repressoren GbsR und OpcR.	98
Abbildung 47 Das Zusammenspiel von zwei GbsR-Typ Repressoren und einem Aktivator Reguliert die Aufnahme und Synthese von kompatiblen Soluten in <i>B. subtilis</i>	101
Abbildung 48 Pufferscreen zur Stabilisierung des GbsR Proteins.....	126
Abbildung 49 Größenausschlusschromatographie der Referenzproteine.....	127
Abbildung 50 Sequenzvergleich der GbsR Proteine der Gattung <i>Bacillus</i>	129
Abbildung 51 Sequenzvergleich der GbsR-Typ Proteine, die mit osmotischem Stress assoziiert sind.....	130
Abbildung 52 Sequenzvergleich der GbsR-Typ Proteine, die nicht mit osmotischem Stress assoziiert sind.....	131
Abbildung 53 Phylogenetische Verbreitung der GbsR-Typ Regulatoren innerhalb der Gattung <i>Bacillus</i>	132
Abbildung 54 Kristallisation des OpuAR Proteins aus <i>P. lautus</i>	133
Abbildung 55 Größenausschlusschromatographie des GbsR ⁸³ G/D Proteins aus <i>B. subtilis</i> und seine Analyse mittels SDS-Gel.....	134
Abbildung 56 Repression der <i>opuB</i> Expression durch OpcR in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration des Mediums.	135
Abbildung 57 RemA-Bindestellen im intergenen Bereich des <i>opuC</i> Operons und des <i>opcR</i> Gens in <i>B. subtilis</i>	136

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete <i>E. coli</i> Stämme.	18
Tabelle 2 Verwendete <i>B. subtilis</i> Stämme.	18
Tabelle 3 Verwendete Plasmide.	23
Tabelle 4 Verwendete Oligonucleotide.	24
Tabelle 5 Minimalmedium A (MMA).	27
Tabelle 6 Antibiotika und Medienzusätze.	27
Tabelle 7 Zusammensetzung des 10-fach S-Base.	31
Tabelle 8 Zusammensetzung des LS-Mediums.	31
Tabelle 9 Zusammensetzung eines 15%igen SDS-Gels.	36
Tabelle 10 Analyse der GbsR-Bindestelle von <i>opuB</i> durch Mutagenesestudien.	49
Tabelle 11 Analyse der GbsR-Bindestelle nach Nau-Wagner <i>et al.</i> (2012).	128

°C	Grad Celsius
A ₂₆₀	Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm
ABC	ATP-Bindekassette (<i>ATP-binding cassette</i>)
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
AsBet	Arsenobetain
AsCho	Arsenocholin
ATP	Adenosintriphosphat
BCCT	Trimethylammonium Transporter (<i>betaine-choline-carnitine transporter</i>)
Cho	Cholin
Cml ^R	Chloramphenicol-Resistenz
C-terminal	Carboxy-terminal
bp	Basenpaare
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DMG	Dimethylglycin
DMSA	Dimethylsulfoniumacetat
DMSP	Dimethylsulfoniopropionat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E ₄₂₀	Extinktion bei einer Wellenlänge von 420 nm
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>electro mobility shift assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alli</i> (lat: und undere)
EtOH	Ethanol
F ₃₅₀ /F ₃₃₀	Verhältniss der Fluoreszenzintensität bei den Wellenlängen 350 und 330 nm
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
GB	Glycinbetain
gDNA	Genomische DNA
Gsm	Sarkosin-Methyltransferase
HABA	4-Hydroxyazobenzol-2-Carboxy-Säure
K _D	Dissotiationskonstante
KPP	Kalium-Phosphat-Puffer
LB	Luria-Bertani-Medium
LC-ESI-MS	<i>Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
MMA	Minimalmedium A
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid

NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
N-terminal	Amino-terminal
OD ₅₇₈	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglycol
pNPG	para-Nitrophenyl- α -Glucopyranosid
ppm	<i>Parts per million</i>
RBS	Ribosomenbindestelle
rDNA	Ribosomale DNA
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
Sdm	Sarkosin-Dimethylglycin-Methyltransferase
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Sig	Sigmafaktor
SMM	Spizizen's Minimal-Medium
SSS	Natrium/Solut Symporter (<i>sodium/solute symporter</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGS	Tris-Glycin-SDS-Puffer
T _m	Schmelztemperatur
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro volume (<i>volume per volume</i>)
wHTH	<i>winged helix-turn-helix</i>
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

Aminosäuren Einbuchstabencode:

A	Alanin	Q	Glutamin	L	Leucin	S	Serin
R	Arginin	E	Glutaminsäure	K	Lysin	T	Threonin
N	Asparagin	G	Glycin	M	Methionin	W	Tryptophan
D	Asparaginsäure	H	Histidin	F	Phenylalanin	Y	Tyrosin
C	Cystein	I	Isoleucin	P	Prolin	V	Valin

I. Zusammenfassung

Zum Schutz vor osmotischem Stress akkumuliert *Bacillus subtilis* kompatible Solute um den Zellturgor aufrecht zu erhalten. Eines dieser kompatiblen Solute ist Glycinbetain, das entweder durch die Opu-Transporter aus der Umwelt aufgenommen werden kann, oder ausgehend von dem zuvor importierten Vorläufer Cholin durch die Dehydrogenasen GbsB und GbsA synthetisiert werden kann. Stromaufwärts des *gbsAB* Operons ist das Gen *gbsR* lokalisiert, das für einen Cholin-abhängigen MarR-Typ Repressor kodiert, der sowohl die Expression des *gbsAB* Operons als auch das Gencluster des Cholin-spezifischen ABC-Transporters OpuB kontrolliert (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Dieser Regulator vermittelt die Repression seiner Zielgene durch einen "Road-Block" Mechanismus, wofür ein „inverted repeat“ stromabwärts des *gbsAB* und *opuB* Transkriptionsstarts gebunden wird. Eine Mutagenesestudie auf Basis eines Homologiemodells des dimeren GbsR Proteins zeigte, dass Cholin durch eine aromatische Ligandenbindetasche in GbsR gebunden wird. Diese ähnelt den Bindetaschen aus Substratbindeteinen, die mit ABC-Transportern für kompatible Solute assoziiert sind. Umfangreiche bioinformatische Analysen zeigten, dass GbsR den Prototyp für eine neue Sub-Familie der MarR-Typ Regulatoren darstellt. Diese beinhaltet Regulatoren, die mit der Glycinbetain Synthese, Aufnahmesystemen für kompatible Solute und Sauerstoff Reduktasen des Cytochrom *bd*-Typs assoziiert sind. Die Regulatoren sind innerhalb der *Bacteria* und *Archae* weit verbreitet.

In *B. subtilis* sind Gene für GbsR-Typ Regulatoren mit den nahe verwandten Operonen *opuB* (YvaV) und *opuC* (OpcR) assoziiert (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013). Die beiden Gencluster zeigen ein sehr unterschiedliches Expressionsmuster in Antwort auf verschiedene extrazelluläre Salinitäten. Jedoch teilen sie die Regulation durch den GbsR-Typ Repressor OpcR, der in die Reetablierung der *opuC* Repression unter Hochsalzbedingungen involviert ist. Diese Funktion steht im Einklang mit der osmotischen Induktion des *opcR* Gens. Die Expression des *opuB* und *opuC* Operons ist zudem, durch den Regulator RemA, der als Aktivator der Biofilmmatrix Synthese agiert, mit der Biofilmbildung verknüpft (Winkelman *et al.*, 2013).

In *B. subtilis* ist kein GbsR-Typ Regulator mit dem *opuA* Operon assoziiert. Dies ist jedoch der Fall in dem marinen Bakterium *Bacillus infantis*. OpuAR wird durch ein Gen in direkter Nachbarschaft des *opuA* Genclusters kodiert und agiert als Cholin- und Glycinbetain-abhängiger Repressor der *opuA* Expression. Im Gegensatz zu zuvor untersuchten Aufnahmesystemen für kompatible Solute zum Zweck der Osmoprotektion wird die *opuA* Transkription nicht durch erhöhte Osmolaritäten induziert. Stattdessen findet eine Induktion in Gegenwart der Substrate des Transporters statt.

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die hochgradig komplexe Regulation von Bakteriellen Anpassungsmechanismen, die das Überleben der Zelle unter osmotisch ungünstigen Bedingungen sicherstellen.

II. Summary

Confronted with hyperosmotic stress, the soil bacterium *Bacillus subtilis* accumulates compatible solutes to maintain cell turgor. Glycine betaine is such a compatible solute that can either be taken up from the environment by various Opu-transporters or can be synthesized from the prior imported precursor choline by the dehydrogenases GbsB and GbsA. Upstream of the *gbsAB* gene cluster, the *gbsR* gene is located which encodes a MarR-type choline-responsive repressor regulating the expression of the *gbsAB* operon as well as the *opuB* operon, encoding a choline-specific ABC-Transporter (Nau-Wagner *et al.*, 2012). This regulator mediates repression of its target genes through a road block mechanism by binding at an inverted repeat downstream of the transcriptional start site of the *gbsAB* and the *opuB* operons. A comprehensive targeted mutagenesis study based on a homology model of the dimeric GbsR protein provided evidence that choline is bound by an aromatic cage present in GbsR, which presumably matches that of substrate binding proteins acting in conjunction with ABC-Transporters. Extensive bioinformatic analyses highlighted GbsR as the prototype for a new sub-family of MarR-type regulators including members which are associated with glycine betaine synthesis, uptake systems for compatible solutes or oxygen reductases of the cytochrome *bd*-type. These types of proteins are frequently found among *Archaea* and *Bacteria*.

Genes for GbsR-type regulators associated with the closely related *opuB* (YvaV) and the *opuC* (OpcR) operon are present in *B. subtilis* (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013). Both geneclusters show a strikingly different expression pattern in response to extracellular salinities. However, they share the regulation through the GbsR-type repressor OpcR, which is involved in the re-establishment of *opuC* repression under high salt concentrations, a function in agreement with the salt-induced expression of the *opuCR* gene itself. The expression of the *opuB* and *opuC* operon is connected to the formation of biofilms through the regulatory protein RemA, which acts as an activator of biofilm matrix synthesis, but also as an activator of the *opuB* and *opuC* transcription (Winkelman *et al.*, 2013).

In *B. subtilis* no GbsR-type regulator is connected to the *opuA* operon. However, this is the case in the marine bacterium *Bacillus infantis*. OpuAR is encoded next to the *opuA* genecluster and acts as a choline- and glycine betaine-responsive repressor of *opuA* expression. In contrast to previously studied osmoprotectant uptake systems, *opuA* transcription in *B. infantis* is not enhanced in the presence of elevated osmolarities, but through the presence of its substrates.

Taken together, this work demonstrates the highly complex regulatory mechanisms leading to the survival of bacteria under osmotically unfavourable conditions.

II . Einleitung

Bakterien sind ubiquitär in der Natur zu finden. Maßgeblich für ihre Verbreitung ist die Entwicklung von Anpassungsmechanismen an veränderliche Umweltbedingungen. Hierzu zählen neben Veränderungen des Nährstoffangebots auch abiotische Faktoren wie Veränderungen in der Sauerstoffverfügbarkeit, sowie Schwankungen des pH-Wertes, der Temperatur oder der Osmolarität ihrer Umgebung. (Earl *et al.*, 2008; Mundic-Mulec *et al.*, 2015). Das Gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis* ist sowohl in terrestrischen als auch marinen Ökosystemen und in der Rhizosphäre zu finden. Vorwiegend bewohnt dieses Bakterium jedoch die oberen Schichten des Bodens, wo es durch unterschiedliche Wetterverhältnisse starken Schwankungen der Osmolarität ausgesetzt ist (Wood, 1999; Earl *et al.*, 2008; Mundic-Mulec *et al.*, 2015; Hoffmann und Bremer, 2017). Während es durch Trockenperioden und Sonneneinstrahlung zum Austrocknen des Bodens kommt, wodurch hyperosmolare Bedingungen in relation zum Zellinneren generiert werden, entstehen durch Überflutung des Bodens hypoosmolare Bedingungen. Beide Extreme beeinflussen den lebenswichtigen Turgor der Zelle (Typas *et al.*, 2012). Durch die Anwesenheit von Nukleinsäuren, Proteinen und Metaboliten weist die Zelle ein hohes osmotisches Potential auf (Wood, 2011). Unter hypoosmolaren Bedingungen strömt daher Wasser, entlang des Konzentrationsgefälles, durch die semipermeable Zellmembran in die Zelle, wodurch diese ohne entsprechende Anpassungsmechanismen platzen würde (Booth und Blount, 2012; Booth, 2014). Umgekehrt strömt unter hyperosmolaren Bedingung Wasser aus der Zelle hinaus, was zu Dehydration und Plasmolyse führen würde (Wood, 2011; Hoffmann und Bremer, 2017; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018).

1 Antwort auf osmotischen Stress

Bakterien verfügen über keinen Mechanismus für den aktiven (d. h. den Energie verbrauchenden) Transport von Wasser. Um dem passiven Ein- und Ausströmen von Wasser entgegen zu wirken, passt die Zelle ihr osmotisches Potential der Umgebung an (Hoffmann und Bremer, 2016; Hoffmann und Bremer, 2017; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Eine Überflutung des Bodens führt innerhalb kürzester Zeit zu einem drastischen Anstieg des Zellurgors, dem der Peptidoglykanschale der Zelle nicht mehr standhalten kann (Typas *et al.*, 2012; Booth und Blount, 2012; Reuter *et al.*, 2014). Ein Platzen der Zelle unter diesen Bedingungen wird durch das Öffnen von mechanosensitiven Kanälen verhindert. Diese werden bei erhöhten Druck auf die Zytoplasmamembran geöffnet und entlassen unselektiv im Zytoplasma gelöste Substanzen aus der Zelle (Haswell *et al.*, 2011; Booth und Blount, 2012; Booth, 2014).

Um den Wasserausstrom unter hyperosmolaren Bedingungen zu verhindern erhöhen Mikroorganismen das osmotische Potential ihres Zytoplasmas. Einige *Archaea* und *Bacteria*,

die vorwiegend unter permanent hohen Salinitäten leben verwenden zu diesem Zweck die „salt-in“ Strategie. Hierbei werden große Mengen anorganischer Salze, vorwiegend Kalium- und Chloridionen, in der Zelle akkumuliert (Oren, 2013; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Als initiale Stressantwort nimmt auch *B. subtilis* Kaliumionen aus der Umgebung auf. Hierfür verfügt die Zelle über die drei Importer KtrAB, KtrCD und KimA (Holtmann *et al.*, 2003; Gundlach *et al.*, 2017). Durch permanent hohe Ionenstärken des Zytoplasmas werden jedoch essentielle Vorgänge in der Zelle wie etwa die Proteinbiosynthese gestört (Yancey *et al.*, 1982; Wood, 2011). Aus diesem Grund dient die Kaliumaufnahme *B. subtilis* nur als vorübergehender Anpassungsmechanismus. In einem zweiten Schritt erfolgt der Export von Kaliumionen und die Akkumulation von sogenannten kompatiblen Soluten erfolgt (Wood, 1999; Wood, 2011; Hoffmann und Bremer, 2017; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Sie erlauben, das für das Wachstum erforderliche osmotische Potential des Zytoplasmas aufrecht zu erhalten, ohne langfristig die Ionenstärke zu erhöhen.

1.1 Kompatible Solute

Kompatible Solute sind kleine, gut Wasserlösliche organische Verbindungen, die bei einem physiologischen pH neutral sind (Yancey, 2005). Ihre Bezeichnung erhielten sie 1972, da sie in hohen Konzentrationen im Zytoplasma akkumuliert werden können, ohne einen negativen Einfluss auf die zelluläre Physiologie auszuüben (Brown und Simpson, 1972; Csonka, 1989). Kompatible Solute lassen sich in verschiedene chemische Stoffklassen einteilen: Polyole (z. B. Glycerol), Zucker (z. B. Trehalose), Aminosäuren und ihre Derivate (z. B. Prolin, Glycinbetain, Ectoin) und Dimethylsulfonium-Verbindungen (z. B. DMSP) (Kempf und Bremer, 1998; Yancey, 2005). Sie stabilisieren Proteine, durch einen Mechanismus, der als „preferential exclusion“ bezeichnet wird. Hierbei werden die kompatiblen Solute aus der Hydrathülle der Proteine ausgeschlossen wodurch aus thermodynamischen Gründen ihre korrekte Faltung begünstigt wird (Knapp *et al.*, 1999; Street *et al.*, 2006). Auf Grund dieser Eigenschaft werden kompatible Solute auch als „chemische Chaperone“ bezeichnet (Bourot *et al.*, 2000; Ignatova und Gierasch, 2006; Stadmler *et al.*, 2017). Neben ihrer osmoprotektiven Funktion, können kompatible Solute auch vor Temperaturstress (Hitze und Kälte) schützen (Holtmann und Bremer, 2004; Hoffmann und Bremer, 2011; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Hierfür werden sie entweder *de novo* Synthetisiert oder aus der Umwelt aufgenommen (Galinski und Trüper, 1994).

1.2 Aufnahme von kompatiblen Soluten in *B. subtilis*

Die von *B. subtilis* genutzten kompatiblen Solute werden entweder durch Pflanzen oder andere Mikroorganismen synthetisiert. Sie gelangen durch Sekretion, verrottendes

Pflanzenmaterial oder das Öffnen von mikrobiellen mechanosensitiven Kanälen unter hypoosmotischen Bedingungen in den Boden (Welsh, 2000; Warren, 2014; Bouskill *et al.*, 2016). Um diese aufzunehmen verfügt *B. subtilis* über fünf bekannte „osmostress protectants uptake“ Systeme, die Opu-Transporter (Hoffmann und Bremer, 2016; Hoffmann und Bremer, 2017). Diese osmotisch regulierten Importer unterscheiden sich bezüglich ihrer Substratspezifität (Abbildung 1) und ihrer Zugehörigkeit zu verschiedenen Transporter Klassen (Hoffmann und Bremer, 2017).

Die Importer OpuD und OpuE sind Einzelkomponententransporter. OpuD dient hauptsächlich der Aufnahme von Glycinbetaine, transportiert jedoch auch DMS, DMG und Prolinbetain [Abbildung 1 (Kappes *et al.*, 1999; Hoffmann und Bremer, 2011; Bashir *et al.*, 2014b; Bashir *et al.*, 2014a)]. Dieser Transporter zählt zu der Familie der Betain-Cholin-Carnitin-Transporter (BCCT, „betaine-choline-carnitine transporter“) (Ziegler *et al.*, 2010), während der Prolin-spezifische Transporter OpuE (Abbildung 1) ein Mitglied der SSS-Transporter Familie („sodium/solute symporter“) darstellt (von Blohn *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 2012).

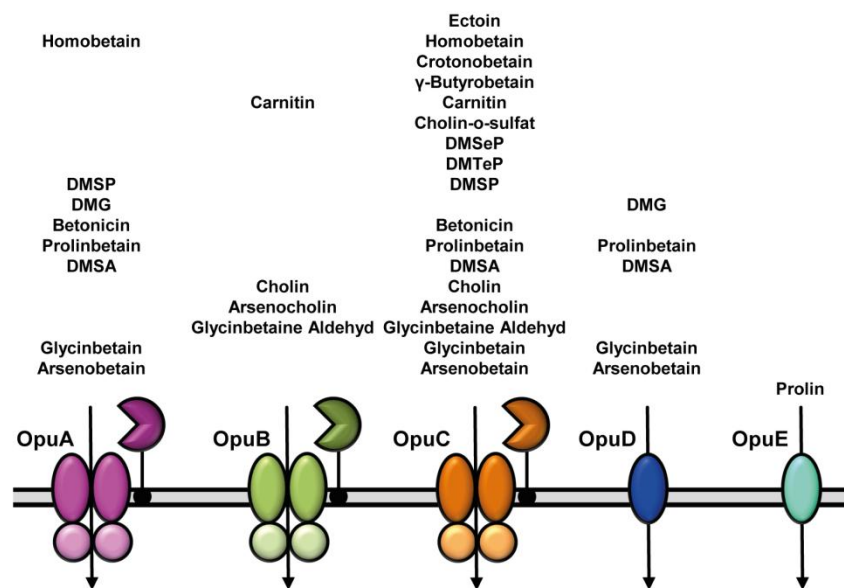


Abbildung 1 Substratspektrum der Opu-Transporter in *B. subtilis*.

Dargestellt sind die drei ABC-Transporter, der BCCT-Transporter OpuD und der SSS-Transporter OpuE. Die entsprechenden Substratspektren sind angegeben (Hoffmann und Bremer, 2017; Teichmann *et al.*, 2017; Hoffmann *et al.*, 2018).

Bei OpuA, OpuB und OpuC (Kempf und Bremer, 1995; Kappes *et al.*, 1999) handelt es sich um Vertreter der Substratbindeprotein-abhängigen ABC Superfamilie (Davidson *et al.*, 2008; Berntsson *et al.*, 2010; Eitinger *et al.*, 2011; Ford und Beis, 2019). Transporter dieser Familie lassen sich in allen Domänen des Lebens finden. Sie verfügen über einen modularen

Aufbau. Dabei durchspannen typischerweise zwei transmembrane Domänen die Zytoplasmamembran. Zwei im Zytoplasma lokalisierte ATPase Domänen dienen der Energetisierung des Transportvorganges durch die Hydrolyse von ATP. Hierbei handelt es sich zudem um die namensgebende Untereinheit („ATP binding cassette“) (Davidson *et al.*, 2008; Locher, 2016). Extrazelluläre Substratbindepoteine dienen der Bindung des Substrates und übergeben dieses an die transmembranen Domänen. Bei Gram-positiven Bakterien sind sie entweder durch einen Lipidanker in der Zellmembran befestigt oder sind an die Permease fusioniert (Obis *et al.*, 1999; Wolters *et al.*, 2010; Lewinson und Livnat-Levanon, 2017; Teichmann *et al.*, 2018). Das OpuA System in *B. subtilis* dient der Aufnahme von kompatiblen Soluten wie Prolinbetain, DMSP, DMG, DMSA, Homobetain und Betonin. Besonders effizient wird Glycinbetain durch den OpuA Transporter importiert [Abbildung 1 (Kempf und Bremer, 1995; Holtmann und Bremer, 2004; Horn *et al.*, 2005; Smits *et al.*, 2008; Bashir *et al.*, 2014b; Bashir *et al.*, 2014a; Broy *et al.*, 2015)].

Die Transporter OpuB und OpuC stellen auf Grund ihrer großen Ähnlichkeit zueinander eine Besonderheit dar (Kappes *et al.*, 1999; Teichmann *et al.*, 2017). Ihre beiden Substratbindepoteine OpuBC und OpuCC weisen eine Sequenzidentität von 69% auf. Die Sequenzidentitäten der ATPasen (OpuBA und OpuCA) liegt bei 83%, während dieser Wert für die transmembranen Domänen (OpuBB und OpuCB bzw. OpuBD und OpuCD) bei 85% liegt (Kappes *et al.*, 1999). Die starke Homologie des OpuB und des OpuC Transporters, sowie die räumliche Nähe der kodierenden Gene innerhalb des Chromosoms deuten darauf hin, dass die beiden Systeme durch eine Genduplikation auseinander hervorgegangen sind (Kappes *et al.*, 1999). Das Vorkommen des OpuC Systems in evolutionär älteren *Bacillus* Stämmen legt eine Entwicklung des OpuB Transporters aus dem OpuC System nahe (Teichmann *et al.*, 2018). Obwohl die beiden Transporter einen hohen Verwandtschaftsgrad aufweisen, unterscheiden sie sich deutlich in Hinblick auf ihre Substratspektren (Abbildung 1). Während OpuC ein breites Substratspektrum aufweist und mit Ausnahme von Prolin und DMG alle für *B. subtilis* bekannten kompatiblen Solute transportieren kann, dient OpuB als spezifisches Aufnahmesystem für die Vorläufer der Glycinbetain Synthese Cholin und Glycinbetain Aldehyd [Abbildung 1 (Boch *et al.*, 1996; von Blohn *et al.*, 1997; Nau-Wagner *et al.*, 2012; Hoffmann *et al.*, 2012; Bashir *et al.*, 2014b; Hoffmann und Bremer, 2017)]. Zudem dient der OpuB Transporter als Importer für Carnitin, dies jedoch mit geringer Affinität (Teichmann *et al.*, 2017).

1.3 Synthese von Glycinbetain

Die Trimethylammonium Verbindung Glycinbetain stellt das am weitesten verbreitete kompatible Solut in der Natur dar und wird von Vertretern aus allen drei Domänen des Lebens zum Zweck der Osmoprotektion verwendet (Yancey, 2005).

Einige halophile Cyanobakterien, Schwefelbakterien und *Archaea* sowie *Myxococcus xanthus* sind in der Lage Glycinbetain aus einfachen Kohlenstoffverbindungen *de novo* zu synthetisieren (Reed *et al.*, 1986; Lai *et al.*, 1991; Lai *et al.*, 1999; Nyssola *et al.*, 2001; Kimura *et al.*, 2010). Hierbei findet eine dreistufige Methylierung von Glycin statt. Da die intrazelluläre Synthese von Glycin ausgehend von 3-Phosphoglycerat, einem Intermediat der Glykolyse, stattfindet besteht eine enge Verknüpfung zwischen dem Methyltransferase Weg und dem zentralen Metabolismus der Zelle (Nyssola *et al.*, 2001). Die Methylierung von Glycin zu Glycinbetain erfolgt in drei Schritten, mit Hilfe von Adenosylmethionin als Methyl-Donor, über die Intermediate Sarkosin und Dimethylglycin (DMG). Eine Katalysation der Reaktionen erfolgt durch eine Glycin-Sarkosin-Methyltransferase (Gsm) und eine Sarkosin-Dimethylglycin-Methyltransferase (Sdm). Diese zwei Enzyme weisen ein teilweise überlappendes Substratspektrum auf so, dass die Methylierung von Sarkosin zu DMG sowohl durch die Gsm als auch die Sdm katalysiert werden kann [Abbildung 2A (Nyssölä *et al.*, 2000; Nyssola *et al.*, 2001; Waditee *et al.*, 2005; Kimura *et al.*, 2010)]. Da für die Regenerierung des Methylgruppen-Donors Adenosylmethionin 12 ATP Äquivalente benötigt werden, handelt es sich bei diesem Syntheseweg um einen sehr energieintensiven Prozess, der in heterotrophen Bakterien wenig verbreitet ist (Atkinson, 1977; Nyssölä *et al.*, 2000).

Die meisten dieser Bakterien verfügen stattdessen über Aufnahmesysteme für den Vorläufer Cholin, der über das Intermediat Glycinbetain Aldehyd enzymatisch zu Glycinbetain oxidiert wird (Hoffmann und Bremer, 2017; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Hierfür sind unterschiedliche Arten von Enzymen bekannt (Lamark *et al.*, 1991; Boch *et al.*, 1996; Salvi *et al.*, 2014). Die Actinobacteria *Arthrobacter pascens* und *Arthrobacter globiformis* sowie das Betaproteobakterium *Alcaligenes sp.* verfügen für diesen Zweck über eine lösliche FAD-haltige Cholinoxidase. Dieses bifunktionale Enzym ist in der Lage, sowohl die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain Aldehyd, als auch die Oxidation des Intermediats zu Glycinbetain zu katalysieren. Molekularer Sauerstoff dient hierbei unter Bildung von H_2O_2 , als Elektronenakzeptor. Eine zusätzliche Glycinbetain Aldehyd Dehydrogenase dient der Oxidation von Glycinbetain Aldehyd zu Glycinbetain und verhindert so eine Akkumulation des toxischen Intermediats [Abbildung 2B (Ikuta *et al.*, 1977; Ohta-Fukuyama *et al.*, 1980; Rozwadowski *et al.*, 1991; Salvi *et al.*, 2014)]. Zwei weitere Enzymsätze zur Synthese von Glycinbetain konnten in dem Gram-negativen Modelorganismus *E. coli* (Lamark *et al.*, 1991) und dem Gram-positiven Modelorganismus *B. subtilis* (Boch *et al.*, 1996) identifiziert werden. In *E. coli* dient BetT, ein Mitglied der BCCT-Familie (Ziegler *et al.*, 2010), der Aufnahme von Cholin (Lamark *et al.*, 1991). Das so importierte Cholin wird durch die bifunktionale FAD-abhängige Cholin Dehydrogenase BetA zu Glycinbetain Aldehyd bzw. Glycinbetain oxidiert. Im Gegensatz zu der Cholin Oxidase aus *A. pascens* und *A. globiformis*, handelt es sich bei BetA um ein membrangebundenes Enzym (Lamark *et al.*, 1991). BetB, eine NAD-abhängige

Glycinbetain Aldehyd Dehydrogenase katalysiert die Umsetzung des Aldehyds zu Glycinbetain [Abbildung 2C (Falkenberg und Strøm, 1990; Lamark *et al.*, 1991)].

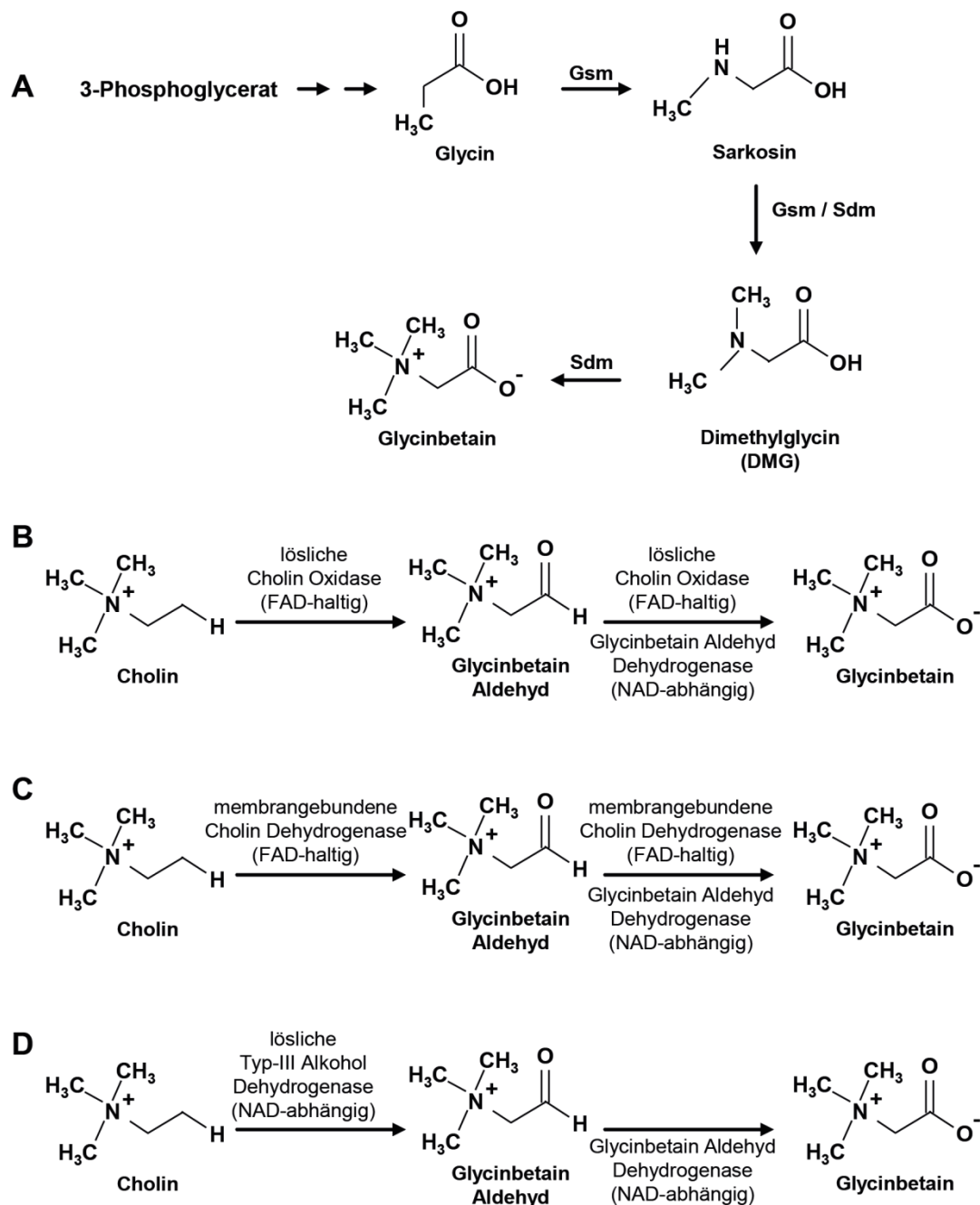


Abbildung 2 Unterschiedliche Wege der Glycinbetain Synthese in Mikroorganismen.

Dargestellt ist (A) die *de novo* Synthese von Glycinbetain durch die Methylierung von Glycin und die Synthese aus dem Vorläufer Cholin (Nyyssola *et al.*, 2001). Für die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain existieren unterschiedliche Enzymkombinationen. Gezeigt ist der Syntheseweg, wie er in (B) den Actinobacteria *Arthrobacter pascens* und *Arthrobacter globiformis* (Ikuta *et al.*, 1977; Rozwadowski *et al.*, 1991; Salvi *et al.*, 2014) sowie dem Betaproteobakterium *Alcaligenes* sp. (Ohta-Fukuyama *et al.*, 1980) vorkommt. Zudem ist der Syntheseweg aus (C) *E. coli* (Lamark *et al.*, 1991) und (D) *B. subtilis* (Boch *et al.*, 1996) dargestellt.

In *B. subtilis* sind zwei separate Enzyme für die schrittweise Oxidation von Cholin verantwortlich (Boch *et al.*, 1996). Die Oxidation von Cholin zu der Zwischenstufe Glycinbetain Aldehyd erfolgt hierbei über die lösliche, NAD-abhängige Typ-III Alkohol Dehydrogenase GbsB. Das Intermediat wird in einem zweiten Schritt durch die ebenfalls NAD-abhängige Glycinbetain Aldehyd Dehydrogenase GbsA zu Glycinbetain umgesetzt [Abbildung 2D (Boch *et al.*, 1996; Boch *et al.*, 1997)]. Die Aufnahme des Vorläufers Cholin erfolgt in *B. subtilis* über die ABC-Transporter (Davidson *et al.*, 2008) OpuB und OpuC (Kappes *et al.*, 1999).

2 Der MarR-Typ Regulator GbsR

Die Enzyme der Glycinbetain Synthese liegen in *B. subtilis* in Form eines Operons (*gbsAB*) kodiert vor. Angrenzend hieran befindet sich, in umgekehrter Orientierung das Gen *gbsR* („glycine betaine synthesis regulator“), das für einen Cholin-abhängigen Repressor der MarR-Familie kodiert (Boch *et al.*, 1996; Nau-Wagner *et al.*, 2012). Mitglieder der MarR-Typ Familie transkriptioneller Regulatoren dienen als Sensoren für Veränderungen in der Umgebung (Wilkinson und Grove, 2006). Namensgebend für diese Familie war das MarR („multiple antibiotic resistance regulator“) Protein aus *E. coli* (George und Levy, 1983a; George und Levy, 1983b), ein Repressor, der eine Rolle in der Resistenz gegen Antibiotika, Desinfektionsmittel und oxidativen Stress einnimmt (Cohen *et al.*, 1993; Wilkinson und Grove, 2006). Über 54000 Gene für MarR-Typ Regulatoren wurden bereits in Vertretern der *Bacteria* und *Archaea* annotiert (Grove, 2017; Gupta *et al.*, 2019). Transkriptionsfaktoren dieser Familie sind an der Regulation vielfältiger physiologischer Prozesse beteiligt. Hierzu zählen neben Resistenzmechanismen Gegenüber Antibiotika auch die genetische Kontrolle von Virulenzfaktoren, dem Katabolismus von aromatischen Verbindungen und der zelluläre Stressantwort (Cohen *et al.*, 1993; Ariza *et al.*, 1994; Sulavik *et al.*, 1995; Martin und Rosner, 1995; Alekshun und Levy, 1999; Perera und Grove, 2010).

MarR-Typ Regulatoren sind homodimere Proteine. Die Monomere weisen einen N-terminalen DNA-Lesekopf mit einem charakteristischen „winged helix-turn-helix“ (wHTH) Motif sowie eine C-terminale Dimerisierungsdomäne auf (Grove, 2017; Deochand und Grove, 2017). Obwohl auch einige MarR-Typ Regulatoren als Aktivatoren beschrieben wurden, agieren die meisten Proteine dieser Familie als Repressoren (Wilkinson und Grove, 2006; Grove, 2013). Palindromische Sequenzen stellen die DNA-Bindestellen von MarR Homologen dar (Perera und Grove, 2010; Deochand und Grove, 2017). Diese überlappen dabei typischerweise mit der Promotorsequenz der regulierten Gene, wodurch die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor verhindert wird. Eine Modulation der Regulation erfolgt entweder durch die Bindung von kleinen Molekülen, die als Liganden des regulatorischen Proteins fungieren, oder aber durch die Oxidation von Cysteinresten,

wodurch eine Konformationsänderung des Proteins hervorgerufen wird (Perera und Grove, 2010; Deochand und Grove, 2017). Für gewöhnlich werden Transkriptionsfaktoren der MarR-Familie angrenzend an die durch sie kontrollierten Gene kodiert. Eine zusätzliche Regulation von weiter entfernten Genen ist jedoch auch möglich. Darüber hinaus lässt sich bei MarR-Typ Regulatoren häufig eine Autoregulation beobachten (Gupta *et al.*, 2019).

2.1 Regulation der Glycinbetain Synthese durch den MarR-Typ Repressor GbsR in *B. subtilis*

In *B. subtilis* kontrolliert der MarR-Typ Regulator GbsR neben der Expression des *gbsAB* Operons auch die Transkription der Gene für den Cholin-spezifischen Transporters OpuB (Abbildung 3), nicht aber die des OpuC Transporters (Kappes *et al.*, 1999; Nau-Wagner *et al.*, 2012). In Abwesenheit von Cholin, bindet GbsR an der intergenen Region zwischen *gbsA* und *gbsR*, wodurch die *gbsAB* Expression verhindert wird (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Dabei erfolgt die Bindung des Repressors an eine Operatorsequenz die einen „inverted repeat“ beinhaltet. Dieser ist stromabwärts des Transkriptionsstartes lokalisiert, wodurch GbsR durch einen „Road-Block“ agiert (Ronzheimer, 2015). Dieser Mechanismus der Genrepression erlaubt es der RNA-Polymerase an den Promotor zu binden, blockiert jedoch die Transkription der kodierenden Gene (Bervoets und Charlier, 2019). Als DNA-Bindestelle innerhalb der Promotorregion des *opuB* Operons wurde ein AT-reiches palindromisches Motiv *in silico* vorhergesagt, welches mit der -35 Region des Promotors überlappt (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Eine experimentelle Überprüfung dieses Vorschlags wurde nicht vorgenommen.

Sowohl Cholin als auch Glycinbetain Aldehyd, das toxische Intermediat der Glycinbetain Synthese erlauben die Induktion der Genexpression. Dabei reichen geringe Konzentrationen von 25 µM Cholin im Medium bereits aus um den Repressor von der DNA zu lösen (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Durch die Anwesenheit von Cholin wird auf diese Weise sowohl die Aufnahme des Substrats durch den OpuB Transporter gesteigert, als auch die Synthese von Glycinbetain durch die Enzyme GbsB und GbsA induziert. Im Gegensatz zu dem *gbsAB* Operon unterliegt die Expression des *opuB* Operons zudem einer osmotischen Induktion (Kappes *et al.*, 1999; Nau-Wagner *et al.*, 2012). Durch Anwesenheit von Glycinbetain erfolgt eine GbsR-abhängige Inhibition der *gbsAB* Expression. Somit ist GbsR nicht nur in der Lage die Glycinbetain Synthese zu initiieren, sondern und auch diese, bei Erreichen eines ausreichenden intrazellulären Pools, zu beenden [Abbildung 3 (Nau-Wagner *et al.*, 2012)]. Eine direkte Bindung von Glycinbetain durch GbsR konnte durch Fluoreszenzspektroskopische Methoden jedoch nicht detektiert werden (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Bianca Warmbold unveröffentlichte Daten).

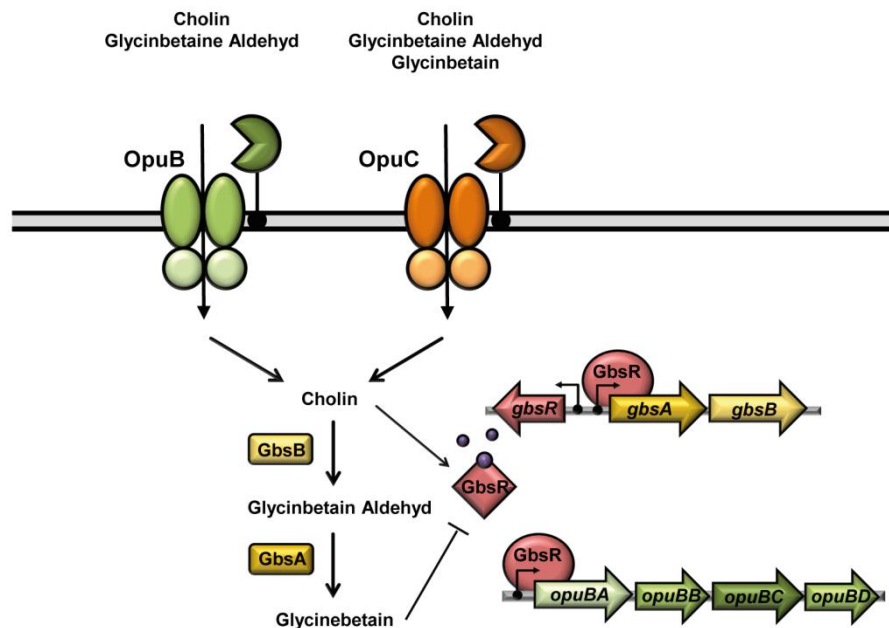


Abbildung 3 Regulation der Glycinbetain Synthese in *B. subtilis* durch den MarR-Typ Regulator GbsR.

Gezeigt sind die Transporter OpuB und OpuC mit ihrem für den Biosyntheseweg von Cholin zu Glycinbetain relevanten Substratspektren (Hoffmann und Bremer, 2017), sowie die Synthese von Glycinbetain aus dem Vorläufer Cholin durch die Enzyme GbsB und GbsA (Boch *et al.*, 1996). Die experimentell bestimmten Promotoren des *opuB* (Kappes *et al.*, 1999) und *gbsAB* (Boch *et al.*, 1996) Operons, so wie des *gbsR* Gens (Nau-Wagner *et al.*, 2012) sind durch gebogene Pfeile dargestellt. Die Expression des *gbsAB* und des *opuB* Operons wird durch den Cholin-abhängigen Repressor GbsR reguliert (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Cholin ist durch violette Punkte repräsentiert.

Durch Nau-Wagner *et al.* wurde ein *in silico* Modell der Proteinstruktur von GbsR (21 kDa) erstellt [Abbildung 4AB (Nau-Wagner *et al.*, 2012)]. Hierfür diente die Kristallstruktur des DNA-bindenden Proteins Mj223 aus dem extrem thermophilen methanogenen Archaeon *Methanococcus (Methanocaldococcus) jannaschii* [Abbildung 4C (Ray *et al.*, 2003)] als Vorlage (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Für diesen Regulator wird eine Funktion in der Kontrolle von Antibiotika-Resistenzgenen angenommen (Ray *et al.*, 2003). Sowohl in Lösung als auch in der Kristallstruktur liegt Mj223 als Homodimer vor (Ray *et al.*, 2003), wobei die Monomere über N-terminale wHTH Domänen zur Bindung von DNA verfügen (Abbildung 4C). Die Kristallisierte Form des Mj223 Homodimers ist jedoch nicht mit der Bindung einer standard B-Form DNA durch beide DNA-Leseköpfe vereinbar (Ray *et al.*, 2003). Ein Model der Protein-DNA-Interaktion wurde von Ray *et al.* (2003) erstellt, wobei die Notwendigkeit einer Konformationsänderung des Proteins deutlich wird (Abbildung 4C). Diese wird vermutlich durch eine flexible Linkerregion ermöglicht, die die DNA-Bindedomäne und die Dimerisierungsdomäne des Proteins miteinander verbindet [Abbildung 4C (Ray *et al.*, 2003)]. Das hiervon abgeleitete *in silico* Model von GbsR (Abbildung 4AB) weist ebenfalls ein N-terminales wHTH Motiv auf, das sich von Aminosäure 49 bis 73 erstreckt. Die Aminosäuren 95 bis 161 bilden die vorhergesagte C-terminale Dimerisierungsdomäne. Die beiden

Domänen werden durch einen flexiblen Linker (AS 74-94) verbunden [Abbildung 4B (Nau-Wagner *et al.*, 2012)].

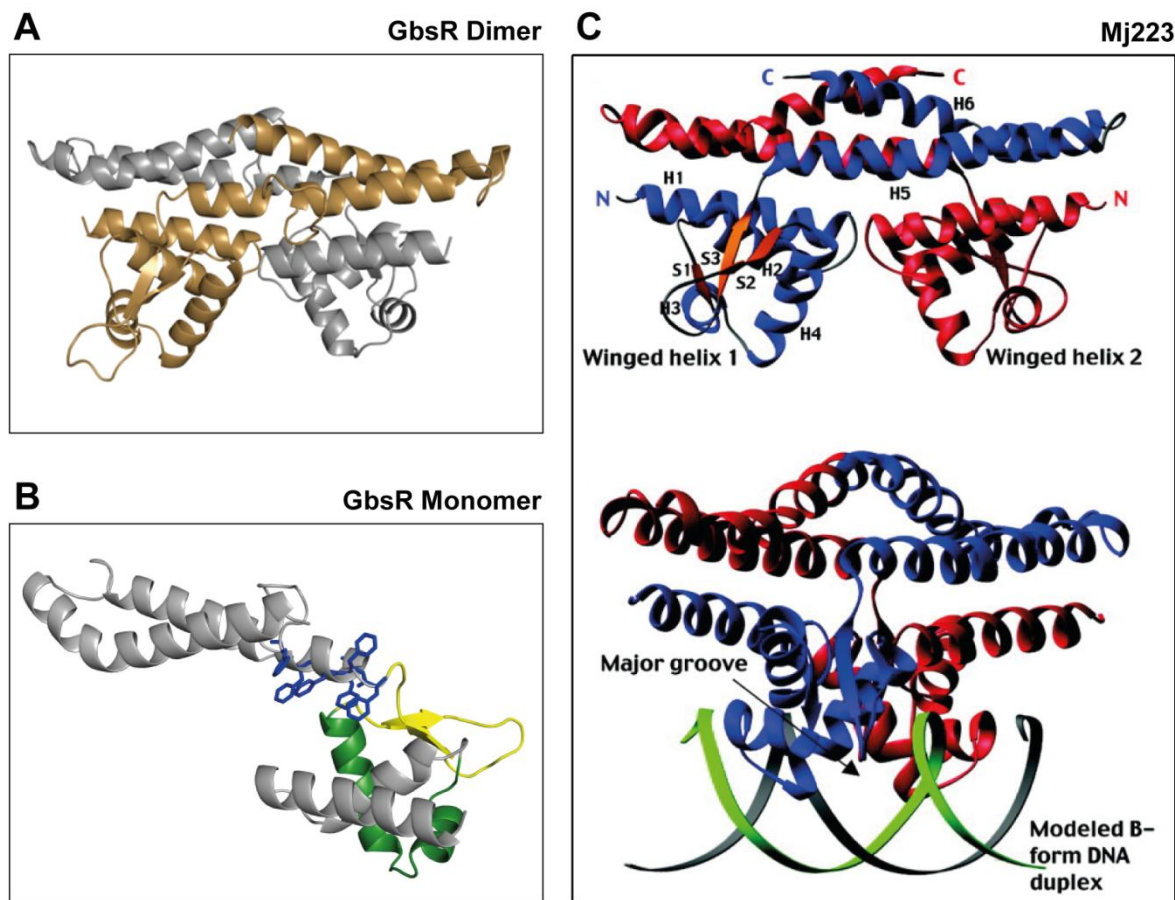


Abbildung 4 *In silico* Model des GbsR Proteins aus *B. subtilis*.

(A) *In silico* Model des homodimeren GbsR (Nau-Wagner *et al.*, 2012) auf Basis des DNA-bindenden Proteins Mj223 aus *M. jannaschii* [PDB 1KU9 (Ray *et al.*, 2003)]. Die beiden Monomere sind in grau und gold dargestellt. (B) Zeigt ein GbsR Monomer. Das „winged helix-turn-helix“ Motiv des DNA Lesekopfs ist in grün und die Linkerdomäne in gelb dargestellt. Die sechs aromatischen Aminosäurereste, der putativen Cholin-Bindetasche sind in blau hervorgehoben. (C) Die Kristallisierte Form des Mj223 Proteins ist nicht mit der Bindung von DNA vereinbar. Ein Model dieser Interaktion wurde von Ray *et al.* (2003) erstellt, wodurch die Notwendigkeit einer Konformationsänderung des Proteins ersichtlich wird (Ray *et al.*, 2003).

GbsR bindet seinen Liganden Cholin mit einer K_D von $165 \pm 15 \mu\text{M}$ (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Ausgehend von bekannten Cholin-Bindeproteinen, gelang es Nau-Wagner *et al.* (2012) eine putative Cholin-Bindebox innerhalb des GbsR Proteins zu identifizieren. Diese ist angrenzend an die Linkerregion, zwischen DNA-Bindedomäne und Dimerisierungsdomäne lokalisiert (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Für die Bindung von Cholin kommen sechs Phenylalaninreste (F^{95} , F^{96} , F^{98} , F^{99} , F^{102} und F^{103}) in Frage [Abbildung 4B (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Ronzheimer, 2015)]. Diese könnten Cholin durch Kationen- π Interaktion binden, einen Mechanismus, der auch bei den Substratbindeproteinen von ABC-Transportern für kompatible Solute zu finden ist (Schiefner *et al.*, 2004a; Schiefner *et al.*, 2004b; Horn *et al.*,

2006; Oswald *et al.*, 2008; Wolters *et al.*, 2010; Du *et al.*, 2011; Pittelkow *et al.*, 2011; Lang *et al.*, 2015). Hierbei kommt es zu einer Interaktion zwischen der positiv geladenen Trimethylammonium-Kopfgruppe des Cholins und dem elektronegativen Oberflächenpotential der Aromaten, wodurch der Ligand in der Bindetasche stabilisiert wird. Die Stärke der Bindung ist hierbei abhängig von dem elektrostatischen Potential des aromatischen Aminosäurerestes (Dougherty, 1996; Ma und Dougherty, 1997; Mahadevi und Sastry, 2013). Eine entsprechende Aromaten-Bindebox konnte in dem *M. jannaschii* Protein Mj223 nicht identifiziert werden (Ray *et al.*, 2003). Aus diesem Grund kann die räumliche Anordnung der aromatischen Seitenketten in der vermuteten Ligandenbindestelle in GbsR (Abbildung 4B) auf Basis des Strukturmodells nicht zuverlässig vorhergesagt werden.

2.2 Verwandte Regulatoren des GbsR Repressors

Durch bioinformatische Analysen konnten GbsR-verwandte Proteine ubiquitär innerhalb der Gattungen *Bacillus* und *Staphylococcus* identifiziert werden. Diese waren nicht nur angrenzend an Gene für die Glycinbetain Synthese zu finden, sondern auch neben solchen, die für Aufnahmesysteme für kompatible Solute kodieren (Nau-Wagner *et al.*, 2012).

Im Rahmen dieser Untersuchung zeigte sich, dass das Glycinbetain Synthesegencluster innerhalb der Gattung *Staphylococcus* konserviert ist (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Näher untersucht wurde hierbei bereits das Gencluster aus *Staphylococcus xylosus* (Rosenstein *et al.*, 1999). Dieses besteht aus den Synthese-Enzymen CudAB, dem BCCT-Transporter (Ziegler *et al.*, 2010) CudT, der als Cholin Importer fungiert, sowie dem Regulator CudC (Abbildung 5). Dieser weist eine Sequenzidentität von 54% mit dem Repressor GbsR aus *B. subtilis* auf (Rosenstein *et al.*, 1999; Nau-Wagner *et al.*, 2012). Wie in *B. subtilis* wird die Expression von *cudAB* auch durch die Anwesenheit von Cholin induziert (Rosenstein *et al.*, 1999).

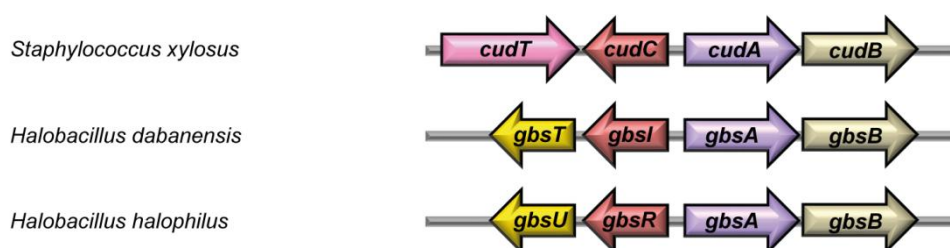


Abbildung 5 Gencluster der Glycinbetain Synthese aus *Staphylococcus xylosus*, *Halobacillus dabanensis* und *Halobacillus halophilus*.

Cholin Dehydrogenase Gene sind in gold dargestellt und Gene, die für Betain Aldehyd Dehydrogenasen kodieren in violett. Die *gbsR*-verwandten Gene sind in rot gekennzeichnet. Während das Gencluster aus *S. xylosus* ein zusätzliches Gen für einen Transporter der BCCT-Familie (*cudT*, pink) enthält (Rosenstein *et al.*, 1999), weisen die Gencluster aus *H. dabanensis* (Gu *et al.*, 2008) und *H. halophilus* (Burkhardt *et al.*, 2009) Gene auf, die vermutlich für Substratbindepoteine von ABC-Transportern kodieren (*gbsT* und *gbsU*, gelb).

Funktionelle Studien wurden auch für die Gencluster aus den moderat halophilen *Halobacillus dabanensis* und *Halobacillus halophilus* durchgeführt (Gu *et al.*, 2008; Burkhardt *et al.*, 2009). Burkhardt *et al.* (2009) zeigten, dass die entgegengesetzt orientierten Gene *gbsU-gbsI* und *gbsA-gbsB* (Abbildung 5) in *H. halophilus* als Operone vorliegen und Cholin-abhängig transkribiert werden (Burkhardt *et al.*, 2009). GbsU zeigt Ähnlichkeiten mit Substratbindeproteinen von ABC-Transportern (Davidson *et al.*, 2008) für kompatibel Solute. Eine Permease oder ATPase konnte jedoch nicht in der Gennachbarschaft identifiziert werden (Burkhardt *et al.*, 2009). Ein ähnlich aufgebautes Gencluster ist in *H. dabanensis* zu finden. Hierbei wurde jedoch eine abweichende Nomenklatur verwendet. Das Substratbindeprotein wurde GbsT genannt, während das GbsR Homolog als GbsI bezeichnet wurde [Abbildung 5 (Gu *et al.*, 2008)].

In einigen Vertretern der Gattung *Bacillus* konnten durch Nau-Wagner *et al.* (2012) mehrere *gbsR* Gene innerhalb eines Genoms festgestellt werden. Hierzu zählt auch *B. subtilis*, der neben dem *gbsAB*-assoziierten *gbsR* Gen zwei verwandte Gene aufweist, die angrenzend an das *opuB* (*yvaV*) und das *opuC* (*yvbf* / *opcR*) Operon kodiert sind [Abbildung 6 (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013)]. Diese Regulatoren weisen eine Aminosäuresequenzidentität von 34% (OpcR) und 35% (YvaV) zu GbsR auf (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Während die Funktion von YvaV bis heute unbekannt ist, konnten Lee *et al.* (2013) eine Funktion von OpcR als Repressor der *opuC* Expression zeigen. In Abwesenheit von GbsR konnte zudem ein reprimierender Effekt auf die *opuB* Transkription gezeigt werden. Im Gegensatz zu GbsR agiert OpcR jedoch nicht als Cholin-Sensor (Lee *et al.*, 2013). Auf Basis von DNA-Bindestudien konnte die OpcR Bindestelle auf einen 38 bp großen Bereich in der Promotorregion des *opuB* und des *opuC* Operons eingegrenzt werden, der einen „inverted repeat“ beherbergt. Dieser überlappt in beiden Fällen mit der -35 Region der SigA-Promotoren (Kappes *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2013). Somit reprimiert OpcR die Expression von *opuB* und *opuC* vermutlich durch sterische Inhibition der RNA-Polymerase (Bervoets und Charlier, 2019).



Abbildung 6 Genetische Organisation der Gencluster *opuB* und *opuC* in *B. subtilis*.

Dargestellt sind die Operone *opuB* (grün) und *opuC* [orange (Kappes *et al.*, 1999)] mit den angrenzenden *gbsR* Genen *yvaV* und *opcR* [rot (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013)]. Zwischen den beiden Genclustern sind Gene lokalisiert, die eine Rolle während des Kanibalismus spielen (González-Pastor, 2011). Sie sind in grau dargestellt.

Ein weiterer GbsR-Typ Regulator, der mit einem Aufnahmesystem für kompatible Solute assoziiert ist, wurde in *Bacillus infantis* identifiziert. Auf Grund seiner Nachbarschaft zu

einem *opuA* Gencluster wurde dieser als OpuAR bezeichnet (Ronzheimer *et al.*, 2018). Im Gegensatz zu *B. infantis* ist in *B. subtilis* kein *gbsR*-Typ Gen angrenzend an das *opuA* Operon zu finden (Kempf und Bremer, 1995; Nau-Wagner *et al.*, 2012). Ebenso wie die zuvor beschriebenen *gbsR* Gene ist auch *opuAR* in entgegengesetzter Orientierung zu dem *opuA* Gencluster kodiert. Dieser ABC-Transporter des OpuA-Typs (Kempf und Bremer, 1995) dient als Importer für die kompatiblen Solute Glycinbetain, Prolinbetain, DMG und DMSP (Ronzheimer *et al.*, 2018). Die Induktion der Genexpression von Aufnahmesystemen für solche Osmoprotektiva erfolgt üblicherweise durch erhöhte Salinitäten (Lucht und Bremer, 1994; Wood, 1999; Wood *et al.*, 2001; Bremer und Krämer, 2010; Hoffmann und Bremer, 2016; Hoffmann und Bremer, 2017). Dies trifft auf die *opuA* Expression nur in geringem Maße zu (Ronzheimer *et al.*, 2018, diese Arbeit), was mit dem marinen Habitat von *B. infantis* (Siefert *et al.*, 2000) zusammenhängen könnte, in dem das Bakterium permanent hohen Salinitäten ausgesetzt ist. Stattdessen fungiert OpuAR als Repressor der *opuA* Expression in *B. infantis* und weist eine Sequenzidentität von 34% zu GbsR aus *B. subtilis* auf. Dieser erlaubt eine Induktion der Genexpression in Gegenwart von Glycinbetain, Prolinbetain und Cholin. Während Glycinbetain und Prolinbetain zu den Substraten des OpuA Transporters zählen, wird Cholin nicht über diesen Transporter importiert und übt auch keine osmoprotektive Funktion in *B. infantis* aus (Ronzheimer *et al.*, 2018). Durch ein *in silico* Model des OpuAR Proteins konnte eine putative Ligandenbindetasche identifiziert werden. Im Gegensatz zu der vorhergesagten Bindebox in GbsR enthält diese jedoch keine sechs aromatischen Aminosäurereste, sondern vier (W⁹³, Y⁹⁴, F⁹⁷ und F¹⁰¹). Bei den nicht-konservierten Positionen handelt es sich um N⁹⁶ und R¹⁰⁰. OpuAR bindet sowohl Cholin (K_D 193 ± 40 µM) als auch Glycinbetain (K_D 301 ± 24 µM). Die Ligandenbindetasche wurde im Rahmen einer Mutagenesestudie bestätigt. Hierbei konnte durch einen simultanen Austausch der Aminosäuren Y⁹⁴ und R¹⁰⁰ gegen Phenylalaninreste, wie sie in GbsR zu finden sind, eine 3- bis 4-fache Verbesserung der Bindeaffinität zu beiden Liganden erzielt werden (Ronzheimer *et al.*, 2018).

Ein weiteres GbsR Homolog, CydE wurde kürzlich in *Alishewanella* sp. WH16-1 untersucht (Xia *et al.*, 2018). Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Vertretern steht dieser GbsR-Typ Regulator jedoch nicht mit der osmotischen Stressantwort in Verbindung. Stattdessen agiert CydE als Repressor des *cydAB* Genclusters, welches für eine Sauerstoff Reduktase des Cytochrom *bd*-Typs kodiert (Xia *et al.*, 2018). Diese dienen vielen Prokaryoten unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen als alternative terminale Oxidase der Atmungskette (Borisov *et al.*, 2011; Degli Esposti *et al.*, 2015). In *Alishewanella* sp. WH16-1 ist dieses Gencluster an der Resistenz gegenüber Sulfiden und Chromaten beteiligt (Xia *et al.*, 2018). CydE weist eine Sequenzidentität von 19% mit GbsR aus *B. subtilis* auf. Anders als GbsR (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Ronzheimer, 2015) interagiert dieser, in der Familie der

Alteromonadaceae verbreitete Regulator, jedoch mit zwei Bindestellen in der Promotorregion des *cydAB* Genclusters (Xia *et al.*, 2018).

3 Osmoprotektion in dem marinen Bakterium *Bacillus infantis*

Die Aufnahme und Synthese von kompatiblen Soluten zum Zweck der Osmoprotektion wurde bereits intensiv in terrestrischen Mikroorganismen wie *B. subtilis* studiert (Earl *et al.*, 2008; Hoffmann und Bremer, 2016; Hoffmann und Bremer, 2017). Dagegen ist nur wenig über diesen wichtigen Anpassungsmechanismus in *Bacilli* bekannt, die marine Habitate bewohnen (Siefert *et al.*, 2000). Im Rahmen bioinformatischer Analysen zu der Verbreitung von Aufnahmesystemen für kompatible Solute (Teichmann *et al.*, 2018) und GbsR-verwandter Proteine (Ronzheimer *et al.*, 2018) rückte *B. infantis* NRRL B-14911, ein mariner Vertreter der Gattung *Bacillus* in den Fokus des Interesses.

Dieses Bakterium wurde aus einer Tiefe von 10 m aus dem Golf von Mexiko isoliert, ist ein aerob lebender Sporenbildner und bildet ein rosa Pigment (Siefert *et al.*, 2000). *B. infantis* toleriert Salinitäten von 0,8 M NaCl (Siefert *et al.*, 2000; Ronzheimer *et al.*, 2018). Eine Protektion unter hyperosmolaren Bedingungen erfolgt vorallem durch Glycinbetain und Prolinbetain. Einen geringeren Grad an Protektion vermitteln aber auch Homobetain, DMG und das, in marinen Habitaten weit verbreitete, schwefelhaltige Osmolyt DMSP (Broy *et al.*, 2015; Ronzheimer *et al.*, 2018). Das Genom von *B. infantis* ist vollständig Sequenziert (Massilamany *et al.*, 2016) und bioinformatische Analysen identifizierten Transporter des OpuA-, OpuD-, OpuE- und OpuF-Typs (Teichmann *et al.*, 2018). Gene für die osmoadaptive Synthese von Prolin wurden nicht gefunden (Hoffmann *et al.*, 2017). Sowohl der OpuA- als auch der OpuF-Transporter von *B. infantis* wurden bereits näher charakterisiert (Teichmann *et al.*, 2018; Ronzheimer *et al.*, 2018).

OpuA dient als Importer für die kompatiblen Solute Glycinbetain, Prolinbetain, Homobetain und DMSP und mit geringerer Effizienz auch DMG. Das entsprechende Gencluster weist den gleichen Aufbau aus ATPase (*opuAA*), Permease (*opuAB*) und Substratbindepotein (*opuAC*) wie das Gegenstück aus *B. subtilis* auf (Kempf und Bremer, 1995; Ronzheimer *et al.*, 2018). Jedoch ist in *B. infantis* angrenzend an das *opuA* Gencluster ein GbsR-Typ Repressor (OpuAR) kodiert (Ronzheimer *et al.*, 2018). Der Mechanismus der OpuAR-abhängigen Regulation des *opuA* Genclusters ist in Abschnitt 2.2 beschrieben.

Bei OpuF handelt es sich um ein Mitglied der ABC-Transporter Familie (Davidson *et al.*, 2008), der mit dem OpuC Transporter aus *B. subtilis* verwandt ist (Teichmann *et al.*, 2018). OpuF besteht neben einer ATPase aus einer bifunktionalen Untereinheit, in der die transmembrane Domäne und das Substratbindepotein in Form von eines fusionierten Proteins vorliegen (Teichmann *et al.*, 2018). Dieser Transporter verfügt, mit Ausnahme von

DMSP, über das gleiche Substratspektrum wie der OpuA Transporter (Teichmann *et al.*, 2018; Ronzheimer *et al.*, 2018).

III. Zielsetzung

Die Synthese des kompatiblen Soluts Glycinbetain (*gbsAB*), sowie die Aufnahme des Vorläufers Cholin über den spezifischen Transporter OpuB aus *B. subtilis* unterliegen der transkriptionellen Kontrolle des Cholin-abhängigen MarR-Typ Repressors GbsR (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Wie GbsR die Regulation des *gbsAB* und *opuB* Operons vermittelt ist jedoch nicht vollständig verstanden (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Ronzheimer, 2015). Neben der charakterisierung der DNA-Protein Interaktion soll auch der Mechanismus der Ligandenbindung durch GbsR untersucht werden.

Homologe dieses Regulators konnten bereits in Zusammenhang mit Genclustern für die Synthese von Glycinbetain und ABC-Transportern für kompatible Solute identifiziert werden (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Die phylogenetische Verbreitung innerhalb der *Bacteria* und *Archaea* soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden. Der bereits bekannte GbsR-Typ Regulator OpuAR aus *B. infantis* agiert als Repressor des angrenzenden *opuA* Genclusters (Ronzheimer *et al.*, 2018). Für dieses System soll nun eine mögliche osmotische Induktion der *opuA* Expression, sowie die oligomere Struktur des Regulators OpuAR geklärt werden. Ein zweiter Vertreter der GbsR-Familie ist OpcR aus *B. subtilis* (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013). Dieser agiert als Repressor der *opuB* und *opuC* Expression. Die physiologische Relevanz dieser Regulation ist bisher jedoch unbekannt (Lee *et al.*, 2013). Das Verständniss dieser Regulation soll durch Reportergenfusionen vertieft werden. Ein besonderer Fokus liegt hierbei auf der Regulation der *opuC* Transkription durch OpcR. Eine Charakterisierung des Repressors in Hinblick auf seine eigene Regulation soll mittels Reportergenstudien durchgeführt werden.

Die nahe verwandten ABC-Transporter OpuB und OpuC aus *B. subtilis* sind hinsichtlich ihrer Substratspezifitäten bereits weitgehend untersucht (Hoffmann und Bremer, 2017; Teichmann *et al.*, 2017; Teichmann, 2018). Das Wissen über ihre transkriptionelle Regulation ist jedoch lückenhaft. Hier ist die Expression der beiden Systeme in Antwort auf unterschiedliche extrazelluläre Salinitäten, sowie die Beteiligung der GbsR-Typ Regulatoren GbsR, OpcR und YvaV (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013) zu untersuchen.

Darüber hinaus ist der Einfluss des Biofilm Regulators RemA zu testen, für den im Rahmen von Microarray Studien gezeigt wurde, dass er neben den Genen für die Bildung der Biofilmmatrix auch die Transkription des *opuA*, *opuB* und *opuC* Operons aktiviert (Winkelman *et al.*, 2013).

IV. Material und Methoden

4 Chemikalien und Materialien

Sofern nicht anders erwähnt, stammen die verwendeten Chemikalien von den Firmen AppliChem (Darmstadt, DE) Carl Roth (Karlsruhe, DE), InvivoGen (San Diego, CA, USA), Merck (Darmstadt, DE) und Sigma-Aldrich (Steinheim, DE). Restriktionsenzyme, Ligasen, dNTP's, Phosphatasen und Größenstandards wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) bezogen. Chromatographiematerial, Anhydrotetracyclin (AHT) sowie Desthiobiotin wurden von der Firma IBA GmbH (Göttingen, DE) bezogen.

5 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonucleotide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgeführt. Für Klonierungen und Präparationen von Plasmiden wurden die *E. coli* Stämme Top10 und NEB5 α verwendet. Der *E. coli* Stamm BL21 wurde für die heterologe Expression von Proteinen genutzt.

Tabelle 1 Verwendete *E. coli* Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
Top10	F ⁻ λ -E44 $\Delta(lacZYA-argF)$ U169 Φ 80 $\Delta lacZ$ Δ M15 <i>hsdR17</i> (r K-m K+) <i>recA1 endA thi-1 relA1 gyrA96</i>	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
NEB5 α	<i>fhuA2</i> $\Delta(argF-lacZ)$ U169 <i>phoA glnV44</i> Φ 80 $\Delta(lacZ)$ M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	New England BioLabs GmbH (Ipswich, MA, USA)
BL21	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>dcm+</i> Tetr <i>gal endA</i>	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

In Tabelle 2 sind alle in dieser Arbeit verwendeten und konstruierten *B. subtilis* Stämmen aufgeführt. Es handelt es sich um Derivate des Wildtyp-Stammes JH642 (Smith *et al.*, 2014).

Tabelle 2 Verwendete *B. subtilis* Stämme.

Bei allen angegebenen *B. subtilis* Stämmen handelt es sich um Derivate des Wildtyp Stammes JH642.

Stamm	Genotyp	Referenz
JH642	<i>trpC2 pheA1</i>	J. Hoch; BGSC 1A96 (Smith <i>et al.</i> , 2014)
ARO4	$\Delta(treA::erm)2$ (<i>gbsR::neo</i>)1 [<i>amyE::</i> Φ (<i>gbsA</i> ⁻ - <i>treA</i>)8]	A. Rolbetzki
ARO5	$\Delta(treA::erm)2$ (<i>gbsR::neo</i>)1 [<i>amyE::</i> Φ (<i>gbsA</i> ⁻ - <i>treA</i>)9]	A. Rolbetzki
ARO9	$\Delta(treA::erm)2$ [<i>amyE::</i> Φ (<i>gbsA</i> ⁻ - <i>treA</i>)8]	A. Rolbetzki

AROB10	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ (gbsA'-treA)9]	A. Rolbetzki
DHB4	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ (gbsA'-treA)1]	(Nau-Wagner et al., 2012)
DHB12	$\Delta(treA::erm)2$ (gbsR::neo)1 [amyE:: Φ (gbsA'-treA)1]	(Nau-Wagner et al., 2012)
GNB37	$\Delta(treA::erm)2$	(Nau-Wagner et al., 2012)
GNB40	$\Delta(treA::erm)2$ (gbsR::neo)1	(Nau-Wagner et al., 2012)
GNB45	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE::(Δ gbsR)2- Φ (gbsA'-treA)1]	(Nau-Wagner et al., 2012)
GNB46	$\Delta(treA::erm)2$ Δ (gbsAB::neo)2 [amyE::(Δ gbsR)2- Φ (gbsA'-treA)1]	(Nau-Wagner et al., 2012)
GNB48	$\Delta(treA::erm)2$ Δ (gbsR::neo)2 [amyE::(Δ gbsR)2- Φ (gbsA'-treA)1]	(Nau-Wagner et al., 2012)
JSB8	Δ (proHJ::tet)1	(Brill et al., 2011b)
LCSB1	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ opuCA'-treA]2 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LCSB2	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ opuCA'-treA]3 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LCSB3	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ opuCA'-treA]4 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LCSB4	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ opuCA'-treA]5 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LCSB5	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ opuCA'-treA]6 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LCSB6	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ opuCA'-treA]7 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LCSB7	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ (opcR'-treA)1]2 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LCSB8	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ (opcR'-treA)1]3 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LCSB9	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ (opcR'-treA)1]4 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LCSB10	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ (opcR'-treA)1]5 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LCSB11	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ (opcR'-treA)1]6 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LCSB12	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ (opcR'-treA)1]7 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LSB1	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ opuCA'-treA]2 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LSB2	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ opuCA'-treA]3 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LSB3	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ opuCA'-treA]4 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LSB4	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ opuCA'-treA]5 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LSB5	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ opuCA'-treA]6 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LSB6	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ opuCA'-treA]7 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LSB7	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ (opcR'-treA)1]2 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LSB8	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ (opcR'-treA)1]3 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LSB9	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ (opcR'-treA)1]4 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LSB10	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ (opcR'-treA)1]5 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LSB11	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ (opcR'-treA)1]6 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
LSB12	$\Delta(treA::erm)2$ [amyE:: Φ (opcR'-treA)1]7 Δ (remA::neo)2	(Schnabel, 2018)
MFB1	$\Delta(treA::erm)2$ Δ (gbsR::neo)1 [amyE:: Φ (gbsA'-treA)1] (ytl::gbsR[TTC/GCA][Phe102/Ala])	(Fischer, 2017)
MFB2	$\Delta(treA::erm)2$ Δ (gbsR::neo)1 [amyE:: Φ (gbsA'-treA)1] (ytl::gbsR[TTC/AAA][Phe102/Lys])	(Fischer, 2017)
MFB3	$\Delta(treA::erm)2$ Δ (gbsR::neo)1 [amyE:: Φ (gbsA'-treA)1] (ytl::gbsR[TTT/GCA][Phe103/Ala])	(Fischer, 2017)
MFB4	$\Delta(treA::erm)2$ Δ (gbsR::neo)1 [amyE:: Φ (gbsA'-treA)1] (ytl::gbsR[TTT/AAA][Phe103/Lys])	(Fischer, 2017)
MFB5	$\Delta(treA::erm)2$ Δ (gbsR::neo)1 [amyE:: Φ (gbsA'-treA)1] (ytl::gbsR[TTT/AAA][Phe96/Lys])	(Fischer, 2017)
MFB6	$\Delta(treA::erm)2$ Δ (gbsR::neo)1 [amyE:: Φ (gbsA'-treA)1] (ytl::gbsR[TTT/GCA][Phe98/Ala])	(Fischer, 2017)
MFB7	$\Delta(treA::erm)2$ Δ (gbsR::neo)1 [amyE:: Φ (gbsA'-treA)1] (ytl::gbsR[TTT/AAA][Phe98/Lys])	(Fischer, 2017)

MFB8	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TTC/GCA][Phe95/Ala])	(Fischer, 2017)
MFB9	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TTC/AAA][Phe95/Lys])	(Fischer, 2017)
MFB10	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TTT/GCA][Phe96/Ala])	(Fischer, 2017)
MFB11	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TGG/GCA][Trp107/Ala])	(Fischer, 2017)
MFB12	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TTC/GCA][Phe99/Ala])	(Fischer, 2017)
MFB13	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TTC/AAA][Phe99/Lys])	(Fischer, 2017)
MFB14	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TGG/AAA][Trp107/Lys])	(Fischer, 2017)
MFB15	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TTT/CGA][Phe96/Arg])	(Fischer, 2017)
MFB16	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TTC/CGA][Phe99/Arg])	(Fischer, 2017)
MFB17	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TTC/CGA][Phe102/Arg])	(Fischer, 2017)
MFB18	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TTC/CGA][Phe95/Arg])	(Fischer, 2017)
MFB19	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TTT/CGA][Phe98/Arg])	(Fischer, 2017)
MFB20	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TGG/CGA][Trp107/Arg])	(Fischer, 2017)
MFB21	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TTT/CGA][Phe103/Arg])	(Fischer, 2017)
MFB22	$\Delta(treA::erm)2 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1 (ytol::gbsR)]$	(Fischer, 2017)
MFB23	$\Delta(treA::erm)2 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1 (ytol::pBB287)]$	(Fischer, 2017)
MFB24	$\Delta(treA::erm)2 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TTC/GCA][Phe95/Ala])	(Fischer, 2017)
MFB35	$\Delta(treA::erm)2 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TGG/AAA][Trp107/Lys])	(Fischer, 2017)
MFB36	$\Delta(treA::erm)2 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TTC/CGA][Phe95/Arg])	(Fischer, 2017)
MFB37	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TTT/GAG][Phe98/Glu])	(Fischer, 2017)
MFB38	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TTC/GAG][Phe102/Glu])	(Fischer, 2017)
MFB39	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TTC/GAG][Phe95/Glu])	(Fischer, 2017)
MFB40	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TTC/GAG][Phe99/Glu])	(Fischer, 2017)
MFB41	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TGG/GAG][Trp107/Glu])	(Fischer, 2017)
MFB42	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TTT/GAG][Phe96/Glu])	(Fischer, 2017)
MFB43	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]$ (<i>ytol::gbsR</i> [TTT/GAG][Phe103/Glu])	(Fischer, 2017)
STHB01	$\Delta(opcR::zeo)1$	S. Ronzheimer
STHB09	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(yvaV::tet)2$	S. Ronzheimer
STHB14	$\Delta(gbsR::spc)1$	S. Ronzheimer
STHB19	$\Delta(remA::neo)1$	S. Ronzheimer
STHB10	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 \Delta(yvaV::tet)2$	(Ronzheimer et al.,

[illegible]

STHB63	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(yvaV::tet)2 \Delta(gbsR::spc)3$ $\Delta(remA::neo)4 [amyE::\Phi opuBA'-treA]1$	S. Ronzheimer
STHB64	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(opcR::zeo)2 \Delta(yvaV::tet)3$ $\Delta(gbsR::spc)4 \Delta(remA::neo)5 [amyE::\Phi opuBA'-treA]1$	S. Ronzheimer
TMB118	$\Delta(opuA::tet)3 \Delta(opuC::spc)3 \Delta(opuD::neo)2$ $\Delta(opuB::erm)3$	(Teichmann <i>et al.</i> , 2017)
TMB128	$\Delta(treA::erm)2 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)10]1$	T. Hoffmann
TMB129	$\Delta(treA::erm)2 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)11]1$	T. Hoffmann
TMB130	$\Delta(treA::erm)2 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)12]1$	T. Hoffmann
TMB131	$\Delta(treA::erm)2 (gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)10]1$	T. Hoffmann
TMB132	$\Delta(treA::erm)2 (gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)11]1$	T. Hoffmann
TMB133	$\Delta(treA::erm)2 (gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)12]1$	T. Hoffmann

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruierte Stämme:		Konstruktion ^{a)}
BWB23	$\Delta(treA::erm)1 \Delta(gbsR::neo)1 amyE::[\Phi(opuBA'-treA)1]1$	Transformation von GNB40 mit pSTH67
BWB25	$\Delta(treA::erm)2 [amyE::\Phi(opuBA'-treA)2]1$	Transformation von GNB37 mit pBW7
BWB26	$\Delta(treA::erm)2 [amyE::\Phi(opuBA'-treA)3]1$	Transformation von GNB37 mit pBW8
BWB27	$\Delta(treA::erm)2 [amyE::\Phi(opuBA'-treA)4]1$	Transformation von GNB37 mit pBW10
BWB28	$\Delta(treA::erm)2 [amyE::\Phi(opuBA'-treA)5]1$	Transformation von GNB37 mit pBW11
BWB29	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(opuBA'-treA)2]1$	Transformation von GNB40 mit pBW7
BWB30	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(opuBA'-treA)3]1$	Transformation von GNB40 mit pBW8
BWB31	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(opuBA'-treA)4]1$	Transformation von GNB40 mit pBW10
BWB32	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(opuBA'-treA)5]1$	Transformation von GNB40 mit pBW11
BWB33	$\Delta(treA::erm)2 [amyE::\Phi(opuBA'-treA)6]1$	Transformation von GNB37 mit pBW9
BWB34	$\Delta(treA::erm)2 [amyE::\Phi(opuBA'-treA)7]1$	Transformation von GNB37 mit pBW12
BWB35	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(opuBA'-treA)6]1$	Transformation von GNB40 mit pBW9
BWB36	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(opuBA'-treA)7]1$	Transformation von GNB40 mit pBW12
BWB70	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]1$ (<i>ytol::gbsR</i>)	Transformation von DHB12 mit pLT5
BWB71	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(gbsR::neo)1 [amyE::\Phi(gbsA'-treA)1]1$ (<i>ytol::pBB287</i>)	Transformation von DHB12 mit pBB287
BWB127	$\Delta(treA::erm)2 [amyE::\Phi(opcR'-treA)1]1$	Transformation von GNB37 mit pBW34
BWB129	$\Delta(treA::erm)2 [amyE::\Phi(opcR'-treA)1]1 \Delta(remA::neo)2$	Transformation von BWB127 mit gDNA von STHB19
BWB130	$\Delta(treA::erm)2 [amyE::\Phi(opcR'-treA)1]1 \Delta(gbsR::spc)2$	Transformation von BWB127 mit gDNA von STHB14
BWB131	$\Delta(treA::erm)2 [amyE::\Phi(opcR'-treA)1]1 \Delta(opcR::zeo)2$	Transformation von BWB127 mit gDNA von STHB01

BWB132 $\Delta(treA::erm)2 [amyE::\Phi(opcR'-treA)1]1 \Delta(yvaV::tet)3$ Transformation von BWB127 mit gDNA von STHB09

^{a)} Die Bezeichnung gDNA vor dem Stammnamen bedeutet, dass die genomische DNA dieses Stammes für die Transformation verwendet wurde.

Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 3 aufgelistet. In dieser Arbeit genutzte Oligonucleotide sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Sie wurden von der Firma Microsynth (Balgach, CH) synthetisiert.

Tabelle 3 Verwendete Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBB287	<i>B. subtilis</i> Integrationsvektor <i>ytol::tet::ytol</i>	D. Rudner
pJMB1	Vektor mit promotorlosem <i>treA</i> -Reportergen und homologen Bereichen des <i>amyE</i> Locus zur stabilen Integration in <i>B. subtilis</i> , Amp ^R , Cml ^R	Jebbar, M. und Bremer, E.; unveröffentlicht
pDH2_5.2	Derivat von pJMB1; enthält ein 118 bp großes Fragment der <i>B. subtilis gbsA</i> Promotorregion fusioniert an promotorloses <i>treA</i> , Deletion der GbsR Bindestelle (TTAAATTTTATTTAA)	(Schumann, 2015)
pLT5	Derivat von pBB287; enthält <i>gbsR</i> aus <i>B. subtilis</i> mit dem nativem Promotor	(Teichmann <i>et al.</i> , 2017)
pLT25	Derivat von pSTH02; Mutagenese von <i>gbsR</i> aus <i>B. subtilis</i> [GGC/GAC][Gly83/Asp]	(Teichmann, 2018)
pLT29	Derivat von pSTH02; Mutagenese von <i>gbsR</i> aus <i>B. subtilis</i> [TTT/AAA][Phe96/Lys]	L. Teichmann
pLT30	Derivat von pSTH02; Mutagenese von <i>gbsR</i> aus <i>B. subtilis</i> [TTC/GCA][Phe95/Ala]	L. Teichmann
pMP_AR1	pASK-IBA3plus mit <i>opuAR</i> aus <i>B. infantis</i> NRRL B-14911	(Ronzheimer <i>et al.</i> , 2018)
pSTH02	pASG-IBA3 mit <i>gbsR</i> aus <i>B. subtilis</i>	(Ronzheimer, 2015)
pSTH03	pASG-IBA3 mit <i>opuAR</i> aus <i>P. lautus</i>	S. Ronzheimer
pSTH14	pASG-IBA3 mit <i>opcR</i> aus <i>B. subtilis</i>	S. Ronzheimer
pSTH62	Derivat von pJMB1; enthält ein 266 bp großes Fragment der <i>B. subtilis opuCA</i> Promotorregion fusioniert an promotorloses <i>treA</i>	S. Ronzheimer
pSTH67	Derivat von pJMB1; enthält ein 286 bp großes Fragment der <i>B. subtilis opuBA</i> Promotorregion fusioniert an promotorloses <i>treA</i>	S. Ronzheimer
pBW7	Derivat von pSTH67; Mutagenese der GbsR Bindestelle mit <i>opuB_mut1_for</i> und <i>opuB_mut1_rev</i> (Deletion TTAAA)	Diese Arbeit
pBW8	Derivat von pSTH67; Mutagenese der GbsR Bindestelle mit <i>opuB_mut2_for</i> und <i>opuB_mut2_rev</i> (Deletion ACTGAA)	Diese Arbeit

pBW9	Derivat von pSTH67; Mutagenese der GbsR Bindestelle mit opuB_mut3_for und opuB_mut3_rev (Substitution TTAAAT → TTCCCT)	Diese Arbeit
pBW10	Derivat von pSTH67; Mutagenese der GbsR Bindestelle mit opuB_mut4_for und opuB_mut4_rev (Deletion TTAAATTTAAACTGAA)	Diese Arbeit
pBW11	Derivat von pSTH67; Mutagenese der GbsR Bindestelle mit opuB_mut5_for und opuB_mut5_rev (Insertion TTAAATTTAAACTGAA → TTAAATTTTAAACTGAA)	Diese Arbeit
pBW12	Derivat von pSTH67; Mutagenese der GbsR Bindestelle mit opuB_mut6_for und opuB_mut6_rev (Deletion TTAAATTTAAACTGAA → TTAAATAAACTGAA)	Diese Arbeit
pBW34	Derivat von pJMB1; enthält ein 868 bp großes Fragment der <i>B. subtilis</i> <i>opcR</i> Promotorregion fusioniert an promotorloses <i>treA</i> , Klonierung über SmaI und BamHI Schnittstellen	Diese Arbeit
pBW39	Derivat von pSTH02; Mutagenese von <i>gbsR</i> aus <i>B. subtilis</i> [TGG/CGA][Trp107/Arg] mit GbsR_W107_R107_for und GbsR_W107_R107_rev	Diese Arbeit
pBW40	Derivat von pSTH02; Mutagenese von <i>gbsR</i> aus <i>B. subtilis</i> [TTT/CGA][Phe103/Arg] mit GbsR_103_R103_for und GbsR_103_R103_rev	Diese Arbeit

Tabelle 4 Verwendete Oligonucleotide.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung
Sequenzierungsprimer		
pASK_IBA_fw	GTGAAATGAATAGTTTCGAC	Primer zur Sequenzierung des Inserts im Plasmid pASG-IBA3
pASK_IBA_rev	CGCAGTAGCGGTAAACGGC	Primer zur Sequenzierung des Inserts im Plasmid pASG-IBA3
pJMB1-pFSB1_for	ATAAGGGTAACTATTGCCG	Primer zur Sequenzierung des Inserts im Plasmid pJMB1
pJMB1-treA_rev	ACCATTTCCTGTCGTATCG	Primer zur Sequenzierung des Inserts im Plasmid pJMB1
ytol-for	GGAATCACGTGGTCCTTGC	Primer zur Sequenzierung der <i>ytol</i> -Integration
ytol-rev	CCCGACCGGCTTCTTACAG	Primer zur Sequenzierung der <i>ytol</i> -Integration
Klonierungsprimer		
opuCR-treA_for	CTACCCGGGGCAAGCTTAATCGCTTCATCC	Primer zur Amplifikation des <i>treA</i> -Fusionsfragments des Plasmids pBW34; enthält eine SmaI Schnittstelle

opuCR-treA_rev	GATGGATCCCTGGCTC ATCCGTGTTTTGC	Primer zur Amplifikation des <i>treA</i> -Fusionsfragments des Plasmids pBW34; enthält eine BamHI Schnittstelle
Mutageneseprimer		
opuB_mut1_for	TTTAAACTGAACAAATTG AATAAACTTAATTTTG	Primer zur Mutagenese der GbsR Bindestelle auf Plasmid pSTH67 (Deletion TTAAA); Resultat ist das Plasmid pBW7
opuB_mut1_rev	TTTTTCAGACAATTGAAT GCTTC	Primer zur Mutagenese der GbsR Bindestelle auf Plasmid pSTH67 (Deletion TTAAA); Resultat ist das Plasmid pBW7
opuB_mut2_for	CAAATTGAATAAACTTAA TTTTGGAG	Primer zur Mutagenese der GbsR Bindestelle auf Plasmid pSTH67 (Deletion ACTGAA); Resultat ist das Plasmid pBW8
opuB_mut2_rev	TTAAATTTAATTTTTCAGA CAATTGAATG	Primer zur Mutagenese der GbsR Bindestelle auf Plasmid pSTH67 (Deletion ACTGAA); Resultat ist das Plasmid pBW8
opuB_mut3_for	CTGAAAAATTCCCTTTAA ACTGAACAAATTGAATAA ACTTAATTTT	Primer zur Mutagenese der GbsR Bindestelle auf Plasmid pSTH67 (Substitution TTAAAT → TTCCCT); Resultat ist das Plasmid pBW9
opuB_mut3_rev	ACAATTGAATGCTTCCCA TTATAG	Primer zur Mutagenese der GbsR Bindestelle auf Plasmid pSTH67 (Substitution TTAAAT → TTCCCT); Resultat ist das Plasmid pBW9
opuB_mut4_for	CAAATTGAATAAACTTAA TTTTGGAG	Primer zur Mutagenese der GbsR Bindestelle auf Plasmid pSTH67 (Deletion TTAAATTTAACTGAA); Resultat ist das Plasmid pBW10
opuB_mut4_rev	TTTTTCAGACAATTGAAT GCTTC	Primer zur Mutagenese der GbsR Bindestelle auf Plasmid pSTH67 (Deletion TTAAATTTAACTGAA); Resultat ist das Plasmid pBW10
opuB_mut5_for	TTAAACTGAACAAATTGA ATAAACTTAATTTTG	Primer zur Mutagenese der GbsR Bindestelle auf Plasmid pSTH67 (Insertion TTAAATTTAACTGAA → TTAAATTTTAACTGAA); Resultat ist das Plasmid pBW11
opuB_mut5_rev	AAATTTAATTTTTCAGACA ATTGAATG	Primer zur Mutagenese der GbsR Bindestelle auf Plasmid pSTH67 (Insertion TTAAATTTAACTGAA → TTAAATTTTAACTGAA); Resultat ist das Plasmid pBW11
opuB_mut6_for	AAACTGAACAAATTGAAT AAACTTAATTTTG	Primer zur Mutagenese der GbsR Bindestelle auf Plasmid pSTH67 (Deletion TTAAATTTAACTGAA → TTAATAAACTGAA); Resultat ist das Plasmid pBW12
opuB_mut6_rev	ATTTAATTTTTCAGACAAT	Primer zur Mutagenese der GbsR Bindestelle auf Plasmid pSTH67

	TGAATGC	(Deletion TTAAATTTAAACTGAA → TTAAATAAACTGAA); Resultat ist das Plasmid pBW12
GbsR_W107_R107_for	TCCACCTAAACGAGAGC GGGAGG	Primer zur Mutagenese von <i>gbsR</i> auf Plasmid pSTH02 [TGG/CGA][Trp107/Arg]; Resultat ist das Plasmid pBW39
GbsR_W107_R107_rev	AAGAAATTTGTGAAAAAT TTAAAGAAATCC	Primer zur Mutagenese von <i>gbsR</i> auf Plasmid pSTH02 [TGG/CGA][Trp107/Arg]; Resultat ist das Plasmid pBW39
GbsR_F103_R103_for	CACAAATTTCCGACCACC TAAATGGGAG	Primer zur Mutagenese von <i>gbsR</i> auf Plasmid pSTH02 [TTT/CGA][Phe103/Arg] Resultat ist das Plasmid pBW40
GbsR_F103_R103_rev	AAAAATTTAAAGAAATCC TTCTCAG	Primer zur Mutagenese von <i>gbsR</i> auf Plasmid pSTH02 [TTT/CGA][Phe103/Arg] Resultat ist das Plasmid pBW40
Primer für EMSA		
BS_gbsA_for	GGGACTTTGACAGTTTAA AAACC	Forward Primer für das Fragment der <i>gbsA</i> Promotorregion aus <i>B. subtilis</i>
BS_gbsA_rev	ATAAGCCTCCTTGACGTA AATAA	Reverse Primer für das Fragment der <i>gbsA</i> Promotorregion aus <i>B. subtilis</i> ; Primer trägt am 5'-Ende eine Markierung (Dyomics 781)

6 Mikrobiologische Methoden

6.1 Medien

Für die Stammhaltung und Vermehrung der aufgeführten *E. coli* und *B. subtilis* Stämme wurde das Komplexmedium LB (Luria-Bertani) verwendet. Festmedien enthielten zusätzlich 1,5% Agar.

Die Kultivierung der in Tabelle 2 aufgeführten *B. subtilis* Stämme erfolgte in Spizizen's Minimalmedium [SMM (Harwood und Archibald, 1990)], mit 0,5% (w/v) Glukose als Kohlenstoffquelle und einer Lösung aus Spurenelementen (Harwood und Archibald, 1990). L-Tryptophan (20 mg l⁻¹) und L-Phenylalanin (18 mg l⁻¹) wurden dem Medium zugesetzt um die Auxotrophien des *B. subtilis* Wildtyp-Stammes JH642 (*trpC2 pheA1*) (Smith *et al.*, 2014) und dessen Derivaten zu komplementieren. Die Osmolarität des Mediums wurde durch die Zugabe einer konzentrierten NaCl (5 M), KCl (1,2 M), Saccharose (2 M) oder Glycerin (11,35 M) Stammlösung erhöht.

Für die heterologe Expression von Proteinen wurden die *E. coli* Stämme in modifiziertem Minimalmedium A [MMA, Tabelle 5 (Miller, 1972)] kultiviert, welches mit 0,2% Glukose (w/v) als Kohlenstoffquelle, 0,1% Casaminoäuren (w/v), 0,5 mg l⁻¹ Thiamin und 1 mM MgSO₄ vervollständigt wurde.

Tabelle 5 Minimalmedium A (MMA).

Komponenten	Zusammensetzung pro Liter
K ₂ HPO ₄	10,5 g
KH ₂ PO ₄	4,5 g
(NH ₄)SO ₄	1,0 g
NaCitrat x 2 H ₂ O	0,5 g

6.1.1 Medienzusätze

Antibiotika und Anhydrotetracyclin (AHT) wurden als konzentrierte Stammlösungen in Wasser, Ethanol oder Dimethylformamid (DMF) angesetzt und sterilfiltriert (Tabelle 6). Nach dem Autoklavieren der Medien und anschließendem Abkühlen, wurden die Medienzusätze in den angegebenen Konzentrationen (Tabelle 6) beigefügt.

Tabelle 6 Antibiotika und Medienzusätze.

Medienzusatz	Stammlösung	Lösungsmittel	Endkonzentration	
			<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
Erythromycin	2 mg ml ⁻¹	70% EtOH	-	2 µg ml ⁻¹
Chloramphenicol	5 mg ml ⁻¹	70% EtOH	-	5 µg ml ⁻¹
Kanamycin	10 mg ml ⁻¹	dH ₂ O	-	10 µg ml ⁻¹
Spectinomycin	100 mg ml ⁻¹	dH ₂ O	-	100 µg ml ⁻¹
Zeocin	100 mg ml ⁻¹	dH ₂ O	-	35 µg ml ⁻¹
Tetracyclin	10 mg ml ⁻¹	70% EtOH	-	10 µg ml ⁻¹
Ampicillin	100 mg ml ⁻¹	dH ₂ O	100 µg ml ⁻¹	-
AHT	2 mg ml ⁻¹	DMF	0,2 µg ml ⁻¹	-

6.1.2 Kompatible Solute

Die Kompatiblen Solute Cholin und Glycinbetain wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, DE) bezogen. Arsenocholin und Arsenobetain stammen von der Firma Argus Chemicals (Verina, IT). Prolinbetain wurde von der Firma Extrasynthese (Genay, FR) und Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP) von der Firma Carbon Scientific (London, UK) bezogen. Homobetain und Cholin-O-sulfat wurden freundlicherweise von Dr. G. Nau-Wagner (Universität-Marburg, DE) und Dimethylglycin (DMG) von Dr. J. Dickshat (Universität Bonn, DE) zur Verfügung gestellt.

6.2 Sterilisation

Verwendete Glaswaren wurden für mindestens 2 Stunden bei einer Temperatur von 180°C sterilisiert. Hitzeunempfindliche Lösungen und Medien wurden für 20 Minuten bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wie Antibiotika und kompatible Solute wurden sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0,2 µm Porengröße, Carl Roth).

6.3 Wachstumsbedingungen und Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C. Bei Bedarf wurde den verwendeten Medien Antibiotika hinzugefügt. Die genutzten *E.coli* und *B. subtilis* Stämme wurden zunächst auf LB-Agarplatten über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das Wachstum in Flüssigkulturen erfolgte bis zu einem Kulturvolumen von 5 ml im Reagenzglas auf einem Roller. Bei einem größeren Volumen erfolgte die Kultivierung im Erlenmeyer-Kolben auf einem Schüttler (220 rpm), wobei das Volumen des Kolbens das Kultivierungsvolumen um das 5-fache überstieg.

Für Experimente mit *B. subtilis* wurde zunächst eine LB Vorkultur (3 ml) mit einer Einzelkolonie beimpft. Nach 3 Stunden wurde ausgehend von dieser LB Kultur eine Vorkultur in SMM angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Um Kulturen unter hyperosmolaren Bedingungen anzupflanzen wurden morgens 3 ml LB mit den entsprechenden *B. subtilis* Stämmen angeimpft. Nach 3 Stunden wurden 500 µl dieser Kultur in 20 ml SMM überführt und bis zum Erreichen der exponentiellen Phase (OD_{578} 1-1,5) inkubiert (37°C, 220 rpm). Ausgehend von diesen Vorkulturen wurden die Hauptkulturen auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft.

6.4 Ermittlung der Zelldichte

Die Ermittlung der Zelldichte erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 578 nm. Es wurde dabei angenommen, dass eine OD_{578} von 1 einer Zellzahl von $1 \cdot 10^9$ Zellen pro 1 ml entspricht (Miller, 1972). Zellsuspensionen ab einer OD_{578} von 0,5 wurden in dem verwendeten Medium entsprechend verdünnt.

7 Molekularbiologische Methoden

7.1 Präparation von Nucleinsäuren

7.1.1 Präparation von genomischer DNA aus *B. subtilis*

Die Präparation chromosomaler DNA aus *B. subtilis* erfolgte nach dem Protokoll von Marmur (Marmur und Doty, 1961). Hierfür wurden 5 ml LB mit einer *B. subtilis* Einzelkolonie beimpft und für einen Zeitraum von 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die genomische DNA wurde in 100 µl dH₂O aufgenommen und bei 4°C gelagert.

7.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde die Methode der alkalischen Lyse verwendet (Birnboim und Doly, 1979). Hierfür wurde das GeneJET Plasmid Miniprep Kit der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die Präparation von größeren Mengen Plasmid-DNA wurde das Plasmid Midi Kit der Firma

QIAGEN (Hilden, DE) nach einem modifizierten Protokoll verwendet. Hierbei wurde das eingesetzte Volumen der Puffer P1, P2 und P3 verdoppelt, während die weiteren Schritte den Herstellerangaben entsprachen.

7.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte photometrisch unter Verwendung eines UV/VIS-Spektralphotometers (NanoDrop® ND-10.000, PeqLab, Erlangen, DE) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dabei wird angenommen, dass eine A_{260} von 1 etwa 50 µg/ml an doppelsträngiger DNA entspricht (Sambrook und Russell, 2001).

7.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der PCR („Polymerase Chain Reaction“) nach dem Protokoll der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in einem Peqstar Thermocycler (VWR International GmbH, Darmstadt, DE). Als Template diente hierbei 50 ng genomische oder Plasmid-DNA in 50 µl Reaktionsansatz. Die verwendeten Oligonucleotide sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

7.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte anhand ihrer Größe über 1% Agarosegele in TAE Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) bei einer Spannung von 120 V. Als Größenstandard diente der 1 kb DNA Ladder der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Die Auftrennung von DNA-Fragmenten für Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs) erfolgte mit Hilfe von 4% Agarosegelen. Als Größenstandard diente hierbei der Ultra Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Nach erfolgter Auftrennung wurden die Gele in einer Ethidiumbromidlösung ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) für etwa 15 Minuten gefärbt und mit Hilfe eines UV-Durchlichts bei einer Wellenlänge von 302 nm sichtbar gemacht. Mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dyomics-781 (Mycrosynth, Balgach, CH) markierte Fragmente wurden zusätzlich bei einer Wellenlänge von 800 nm mit Hilfe des Odyssey Fc Imager der Firma Li-Cor Bioscience GmbH (Bad Homburg, DE) visualisiert.

7.5 Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation von DNA

Der Restriktionsverdau von PCR-Amplifikaten und Plasmid-DNA erfolgte durch die FastDigest Restriktionsenzyme der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Die eingesetzten Enzymmengen sowie die Inkubationszeiten und Inkubationstemperaturen entsprachen den Herstellerangaben. Für die Dephosphorylierung des 5'-Endes der geschnittenen Plasmid-DNA wurde die thermosensitive alkalische Phosphatase (FastAP) von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) verwendet. Eine Kontrolle der DNA-Restriktion erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

Anschließend wurden der geschnittene Vektor, sowie das PCR-Fragment gereinigt (Abschnitt 7.6) und mit Hilfe der T4 DNA Ligase von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) ligiert. Hierbei wurden 75 ng Vektor-DNA und ein drei-fach molarer Überschuss des zu inserierenden DNA-Fragments nach Herstellerangaben ligiert.

7.6 Reinigung und Fällung von DNA

Die Aufreinigung von PCR-Produkten und linearisierten Plasmiden erfolgte mit dem GeneJET PCR Purification Kit der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) nach Angaben des Herstellers.

Um PCR-Fragmente anzukonzentrieren wurde die DNA mit Natriumacetat und Ethanol gefällt. Hierfür wurden 0,1 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und das 2-fache Volumen Ethanol (100%) zu der DNA gegeben. Die Fällung erfolgte bei -20°C für 2 Stunden. Anschließend wurde die DNA pelletiert (15000 rpm, 4°C, 60 Minuten), mit 70% Ethanol gewaschen und in 30-50 µl dH₂O aufgenommen.

7.7 Zielgerichtete Mutagenese

Zur Einführung von Punktmutationen, Deletionen und Insertionen in Plasmid-DNA wurde das Q5[®] Site Directed Mutagenesis Kit der Firma New England BioLabs GmbH (Ipswich, MA, USA) genutzt. Die eingesetzten Oligonucleotide (Tabelle 4) wurden mit Hilfe des Onlineprogramms NEBaseChanger (<https://nebasechanger.neb.com/>) erstellt und nach Herstellerangaben verwendet.

7.8 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden nach dem Sanger-Verfahren von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, DE) unter Verwendung der in Tabelle 4 gelisteten Primer durchgeführt. Eine Analyse der erhaltenen DNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programms Ape-A plasmid Editor v2.0.47 (M. Wayne Davis, <http://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>).

7.9 Transformation von *E.coli* und *B. subtilis*

7.9.1 Transformation von *E. coli*

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte mit CaCl₂ nach Sambrook und Russel (Sambrook und Russell, 2001). Hierfür wurde eine 200 ml LB-Kultur, ausgehend von einer LB-Vorkultur, auf eine OD₅₇₈ von 0,1 angeimpft und bei 37°C inkubiert. Bei einer OD₅₇₈ von 0,3-0,5 wurden die Zellen für 10 Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend geerntet (4600 rpm, 4°C, 10 Minuten). Die Zellen wurden mit 15 ml kaltem CaCl₂ (0,1 M) gewaschen

und in 4 ml CaCl_2 (0,1 M) mit 15% Glycerin resuspendiert. Aliquots (100 μl) wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation der *E. coli* Zellen wurden 200-300 μg Plasmid-DNA oder 20 μl eines Ligationsansatzes verwendet. Die Zellen wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend erfolgte ein Hitzeshock (42°C , 60 Sekunden) und das sofortige Abkühlen auf Eis für 2 Minuten. Daraufhin wurden die Zellen in 500 μl LB für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Transformanten wurden auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

7.9.2 Transformation von *B. subtilis*

Für die Transformation von *B. subtilis* Zellen wurde die Methode nach Cutting und Vander Horn (Cutting und Vander Horn, 1990) verwendet, wobei die natürliche Kompetenz von *B. subtilis* genutzt wird, die beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase auftritt (Dubnau, 1991). Hierbei wurden 3 ml SMM mit einer Einzelkolonie von einer frischen LB-Agarplatte des zu transformierenden Stammes beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 1 ml dieser Vorkultur wurde verwendet um 20 ml vorgewärmtes LS-Medium (Tabelle 7 und Tabelle 8) anzupflanzen. Nach 3 Stunden Inkubation im Wasserbad (100 rpm, 30°C) wurde 1 ml der in LS-Medium gewachsenen Kultur mit 1 μg chromosomaler DNA oder 5 μg linearisierter Plasmid-DNA gemischt, für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

Tabelle 7 Zusammensetzung des 10-fach S-Base.

Komponenten	Zusammensetzung pro 100 ml
$(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	2 g
K_2HPO_4	14 g
KH_2PO_4	6 g
$\text{NaCitrat} \times 2\text{H}_2\text{O}$	1 g

Tabelle 8 Zusammensetzung des LS-Mediums.

Komponenten	Zusammensetzung pro 20 ml
H_2O	16 ml
10-fach S-Base	2 ml
Glukose (20%)	500 μl
L-Tryptophan (4 g l^{-1})/ L-Phenylalanin (3 g l^{-1})	100 μl
Caseinhydrolysat (2%)	100 μl
Hefeextrakt (10%)	200 μl
Spermin (50 mM)	200 μl
MgCl_2 (1 M)	50 μl

8 Biochemische Methoden

8.1 Nachweis der Amylase-Aktivität

treA-Reporterergenfusionen wurden durch homologe Rekombination stabil in den nicht-essentiellen *amyE* Locus von *B. subtilis* integriert. Die durch das *amyE* Gen kodierte extrazelluläre α -Amylase befähigt *B. subtilis* zur Hydrolyse von Stärke (Ishikura *et al.*, 1977), die sich mit einer Iod-Kaliumiodid-Lösung (0,5% (w/v) Iod, 1% (w/v) Kaliumiodid) anfärben lässt. Hierfür wurden die *B. subtilis* Stämme zur Überprüfung des amylase-negativen Phänotyps auf LB-Agarplatten mit 1% (w/v) Stärke ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach überstreichen der Zellen auf eine neue LB-Agarplatte wurde die Stärkeplatte mit Iod-Kaliumiodid-Lösung überschüttet, wodurch die enthaltene Stärke violett gefärbt wurde. In Anwesenheit des AmyE Enzyms bildet sich ein nicht-gefärbter Hof um die entsprechende Kolonie, da die Stärke hier in Glukose gespalten wurde. Die Abwesenheit eines hellen Lysehof zeigt somit einen amylase-negativen Phänotyp an.

8.2 Bestimmung der TreA-Aktivität

Das Expressionsniveau verschiedener *treA*-Reporterergenfusionen wurde durch die Messung der TreA-Aktivität kolorimetrisch bestimmt. Das verwendete Reporter-gen *treA* aus *B. subtilis* kodiert für eine salztolerante Phospho- α -(1,1)-Glukosidase, die Trehalose-6-Phosphat zu Glukose und Glukose-6-Phosphat spaltet (Helfert *et al.*, 1995). *In vitro* ist das Enzym zudem in der Lage das chromogene Substrat pNPG (para-Nitrophenyl- α -Glucopyranosid) zu spalten, wobei das gelbe Reaktionsprodukt p-Nitrophenol entsteht, welches sich photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm quantifizieren lässt (Gotsche und Dahl, 1995).

B. subtilis Stämme mit den diversen *treA*-Reporterergenfusionen wurden in SMM mit den angegebenen NaCl-Konzentrationen bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} 1-1,5) kultiviert. Aliquots von 1,8 ml wurden durch Zentrifugation geerntet (12000 rpm, 5 Minuten, RT) und bei -20°C gelagert. Bei Bedarf wurden dem Wachstumsmedium kompatible Solute in den angegebenen Konzentrationen hinzugefügt. Für Reporter-gen Studien zur Bestimmung der GbsR-Bindestelle wurden Stämme mit einer *gbsA'-treA* Fusion in SMM bis zum Erreichen einer OD_{578} von 0,4 inkubiert (uninduziert). Danach erfolgte die Zugabe von 0,4 M NaCl und 1 mM Cholin. Nach weiterer Inkubation für 90 Minuten (induziert) wurden erneut Proben pelletiert. Abweichend hiervon erfolgte die Induktion bei Verwendung der *opuBA'-treA* Fusionen lediglich durch die Zugabe von 0,4 M NaCl.

Nach dem Auftauen wurden die Zellpellets in 500 μ l Z-Puffer (Miller, 1972) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch die Zugabe von 25 μ l Lysozym (20 mg ml⁻¹) und die Inkubation für 10 Minuten bei 37°C. Durch anschließende Zentrifugation (12000 rpm, 5

Minuten, RT) wurden Zelltrümmer entfernt. 400 µl des Überstands wurden mit 400 µl Z-Puffer gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 200 µl pNPG-Lösung (4 mg ml⁻¹ in 10 mM KPP, pH 7,5) gestartet. Bis zum Eintreten einer Gelbfärbung (maximal 3 Stunden) wurden die Proben bei 28°C im Wasserbad inkubiert. Durch die Zugabe von 500 µl Na₂CO₃ (1 M) wurde die Reaktion gestoppt. Die Extinktion der Proben wurden bei einer Wellenlänge von 420 nm (E₄₂₀) photometrisch bestimmt und die TreA-Aktivität mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$A_{\text{TreA}} = 1500 * E_{420} / (OD_{578} * V * t * 0,8)$$

A_{TreA}: Spezifische TreA-Aktivität in U mg⁻¹ Protein

E₄₂₀: Extinktion von p-Nitrophenol bei 420 nm

OD₅₇₈: OD der Kultur zum Zeitpunkt der Ernte

V: Volumen des verwendeten Zellextrakts in ml

T: Inkubationszeit in Minuten

8.3 ¹³C-Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

¹³C-NMR Analysen wurden zur Identifikation von kompatiblen Soluten in *B. subtilis* verwendet. Hierfür wurden die *B. subtilis* Stämme JH642 und JSB8 [Δ proHJ (Tabelle 2)] in 600 ml SMM mit 1,2 M NaCl bei 37°C schüttelnd inkubiert (220 rpm). Dem Medium wurden 1 mM Glycinbetain, Cholin, Arsenobetain oder Arsenocholin zugesetzt. Bei Erreichen der späten exponentiellen Phase (OD₅₇₈ 2-2,5) wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und mit 150 ml iso-osmolarem Medium ohne kompatible Solute gewaschen. Die Vorbereitung der Zellextrakte erfolgte mit 80% (v/v) Ethanol (Kuhlmann und Bremer, 2002). Die lyophilisierten Proben wurden in 0,6 ml ²H₂O, mit 3 mg D₄-3-(Trimethylsilyl) Propionat als internen Standard aufgenommen. ¹³C-NMR Spektren wurden auf einem Bruker Avance II 300 MHz Spektrometer [5 mm BBFO (Bruker, Billerica, MA, USA)] bei 75 MHz aufgenommen. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm Topspin 3.1 (Bruker, Billerica, MA, USA). Als Referenz wurden Spektren der Standards Glycinbetain, Cholin, Arsenobetain, Arsenocholin, Prolin und Glutamat (je 25 mg in 600 µl ²H₂O) aufgenommen.

8.4 Bestimmung von intrazellulären Solut-Pools

Die Bestimmung der intrazellulären Pools von Glycinbetain, Cholin, Arsenobetain und Arsenocholin erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. Andreas Seubert (Fachbereich Chemie, Universität-Marburg, DE). Hierfür wurden die *B. subtilis* Stämme JH642 und TMB118 [OpuA⁻, OpuB⁻, OpuC⁻, OpuD⁻ (Tabelle 2)] in 50 ml SMM oder SMM mit 0,4 M bzw. 1,2 M NaCl in

Gegenwart von 1 mM der angegebenen kompatiblen Solute kultiviert. Bei Erreichen einer OD_{578} von 2-2,5 wurden die Zellen durch Zentrifugation (5000 rpm, 10 Minuten, 37°C) geerntet und mit vorgewärmten (37°C) iso-osmolarem Medium ohne kompatible Solute gewaschen. Zellextrakte wurden durch die Verwendung von 80% (v/v) Ethanol angefertigt und Zelltrümmer durch anschließende Zentrifugation (13000 rpm, 30 Minuten, 4°C) entfernt. Die Detektion und Quantifizierung der kompatiblen Solute erfolgte mittels LC-ESI-MS (Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry). Hierfür wurden Glycinbetain, Cholin, Arsenobetain und Arsenocholin unter Verwendung einer 70:30 (v/v) Mischung aus Ammoniumformiat (100 mM Ameisensäure, pH 3,77 in H₂O) und Acetonitril bei einer Flussrate von 0,2 ml min⁻¹ über einen Kationenaustauscher (C6-150/2.0; Metrohm AG, Herisau, CH) getrennt. Die Solute wurden mit einem Agilent MSD G1946D Massenspektrometer mit einer Elektrosprayionisationsquelle nachgewiesen, wobei die Kationen bei einem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) von 104, 118, 165 und 179 im SIM-Modus detektiert wurden. Die Zellextrakte wurden 1:100 mit H₂O verdünnt. Es wurde ein Injektionsvolumen von 5 µl eingesetzt. Wässrige Multi-Analyt Standards im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 60 mg l⁻¹ wurden für die Kalibrierung verwendet.

8.5 Produktion und Reinigung von rekombinanten Proteinen

8.5.1 Heterologe Expression von Proteinen

Die heterologe Expression von Proteinen erfolgte in *E. coli* BL21 Zellen, die in MMA Medium (Abschnitt 6.1) kultiviert wurden. Bei den verwendeten Expressionsplasmiden (Tabelle 3) handelt es sich um Derivate des pASK-IBA3plus bzw. des pASG-IBA3 Vektors. Sie erlauben die Expression von rekombinanten Proteinen mit einem C-terminalen Strep-Tactin Affinitäts-Tag unter der Kontrolle eines Anhydrotetracyclin induzierbaren Promotors.

Der *E. coli* Stamm BL21 wurde mit einem entsprechenden Plasmid transformiert und auf LB-Agarplatten mit Ampicillin selektioniert. Eine Vorkultur wurde beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Hauptkulturen (1-4 l) wurde auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und schüttelnd bei 37°C inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD_{578} von 0,5 durch Zugabe von 200 µl l⁻¹ AHT (2 mg ml⁻¹). Nach 2 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation (4600 rpm, 15 Minuten, 4°C) geerntet und bei -20°C gelagert.

8.5.2 Proteinreinigung via Strep-Tag® Affinitätschromatographie

Nach der heterologen Expression des Zielgens wurden die Zellpellets auf Eis aufgetaut und in Resuspensionspuffer (100 mM KPP pH 8, 300 mM NaCl, 2 mM DTT, 0,4 mM EDTA, 0,5 mM Pefabloc SC, 0,5 mM Benzamidin) aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte durch mehrmaliges Passagieren durch eine Frech Press Zelle (French® Pressure Cell Press; American Instrument Company, Silver Spring, MD, USA). Zelltrümmer wurden durch

anschließende Zentrifugation (18000 rpm, 40 Minuten, 4°C; Hettich Mikro 22R Zentrifuge mit einem 18000rpm 24x3g Rotor) aus dem Lysat entfernt. Die Aufreinigung erfolgte bei 4°C über eine Tropfsäule mittels Strep-Tactin® Superflow® Säulenmaterial (IBA GmbH, Göttingen, DE). Dabei wurde die Säule zunächst mit 5 Säulenvolumen Waschpuffer (100 mM KPP pH 8, 300 mM NaCl) equilibriert. Nach dem Auftragen des Zelllysats wurde die Säule mit 20 Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen und das Fusionsprotein mit 5 Säulenvolumen Elutionspuffer (100 mM KPP pH 8, 300 mM NaCl, 2,5 mM Desthiobiotin) in 1 ml Fraktionen eluiert. Die Regeneration des Säulenmaterials erfolgte durch 15 Säulenvolumen Regenerationspuffer (100 mM KPP pH 8, 300 mM NaCl, 1 mM HABA). Mittels SDS-Gel wurden die Elute auf ihre Reinheit überprüft und bei Bedarf mit Hilfe eines Zentricons mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa (Vivaspin® 6, 20 ml Volumen, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, DE) ankonzentriert.

8.5.3 Gelfiltration

Zur Untersuchung auf Aggregate und Bestimmung der Quatärstruktur der gereinigten Proteine wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Hierfür wurde eine HiLoad 16/600 Superdex 200 pg Säule, in Kombination mit einer Äkta pure (beides GE Healthcare Life Science, Amersham, UK) und einem Puffer aus 100 mM KPP (pH 8) sowie 300 mM NaCl verwendet. Direkt nach der Aufreinigung wurden 2 ml der Proteinlösungen (1-2 mg ml⁻¹) auf die Säule aufgetragen. Als Größenstandards wurden Thyroglobulin (667 kDa), Albumin (66 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Cytochrom C (12,4 kDa) mit einer Konzentration von jeweils 2 mg ml⁻¹ verwendet. Die Referenzproteine wurden von den Firmen GE Healthcare Life Science (Amersham, UK) und Sigma-Aldrich (Steinheim, DE) bezogen.

8.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Überprüfung von heterologen Proteinexpressionen und zur Bestimmung der Reinheit von Proteinen im Anschluss an Affinitäts- und Größenausschlusschromatographien wurde eine SDS-Gelelektrophorese verwendet (Laemmli, 1970). Hierfür wurden 15% SDS-Gele verwendet (Tabelle 9). Vor der Gelelektrophorese wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% (v/v) SDS, 8% Glycerin, 15,6 µM DTT, Bromphenolblau) versetzt und für 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden Zentrifugiert (13000 rpm, 10 Minuten, RT) und der Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Elektrophorese-Kammer der Firma Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA, USA) unter Verwendung eines TGS-Puffers (25 mM Tris-HCl pH 8,8, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) bei einer Stromstärke von 30 mA bis die Bromphenollaufbande das untere Ende des Gels erreichte. Als Standard zur Bestimmung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine diente der PageRuler™

Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Die SDS-Gele wurden mit dem InstantBlue™ Fast Stain (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) gefärbt.

Tabelle 9 Zusammensetzung eines 15%igen SDS-Gels.

Komponenten	Zusammensetzung	
	Trenngel	Sammelgel
1,5 M Tris pH 8,8; 13,8 mM SDS	1,25 ml	-
0,5 M Tris pH 6,8; 13,8 mM SDS	-	1,25 ml
Acrylamid (40%)	1,88 ml	413 µl
TEMED	12,5 µl	10 µl
APS (10%)	12,5 µl	20 µl
H ₂ O	1,88 ml	3,4 ml

8.5.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration von Proteinen wurde photometrisch mit Hilfe des NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) nach den Vorgaben des Herstellers bestimmt.

8.6 Pufferscreen zur Stabilisierung des Proteins GbsR

Um stabilisierende Pufferbedingungen zu identifizieren wurde das GbsR Protein wie in Abschnitt 8.5.2 beschrieben aufgereinigt. Hierbei wurde jedoch ein anderes Puffersystem verwendet. Als Resuspensionspuffer diente ein Puffer aus 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 25% Glycerin, 2 mM DTT, 0,4 mM EDTA, 0,5 mM Pefabloc SC und 0,5 mM Benzamidin (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Der verwendete Waschpuffer bestand aus 100 mM Tris-HCl pH 7,5 und 150 mM NaCl.

Die Stabilität des gereinigten Proteins wurde mit Hilfe eines nano-Differential-Scanning-Fluorimetrieverfahrens (nanoDSF) mit Hilfe des Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies GmbH, München, DE) bestimmt. Hierbei wird eine Veränderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz während der thermischen Entfaltung des Proteins bei den Wellenlängen 330 und 350 nm detektiert. Für die Bestimmung der Schmelzpunkte des Proteins (T_m) wurde die erste Ableitung der Fluoreszenzverhältnisse F_{350}/F_{330} verwendet. Um unterschiedliche Pufferbedingungen zu generieren wurden je 5 µl einer 40-45 µM Proteinlösung mit 20 µl Puffer des Solubility & Stability Screen bzw. des Solubility & Stability Screen 2 (Hampton Research, Aisa Viejo, CA, USA) gemischt. Die anschließende Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte über einen Temperaturbereich von 20-95°C mit einer Temperaturänderung von 2°C min⁻¹. Die hier beschriebenen Messungen erfolgten in

Kooperation mit Dr. Sven-Andreas Freibert (AG Prof. Dr. R. Lill, Fachbereich Medizin, Universität-Marburg, DE).

8.7 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Die Bindung des GbsR-Proteins an die Promotorregion des *gbsAB* Operons wurde mit Hilfe von Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs) analysiert. Hierfür wurde ein 96 bp großes Fragment der Promotorregion mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Der reverse Primer wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dyomics-781 markiert (Mycrosynth, Balgach, CH). Parallel hierzu wurde das Protein GbsR mittels Strep-Tag Affinitätschromatographie gereinigt (siehe Abschnitt 8.5.2). DNA-Bindestudien wurden durchgeführt, indem 1 pmol des gewünschten DNA-Fragments und variierende Mengen des Proteins (1- bis 20-facher molarer Überschuss im Vergleich zu der eingesetzten DNA-Menge) in einem Puffer aus 10 mM Tris-HCl pH 8, 150 µg/ml Hering Sperm DNA und 7,5% (v/v) Glycerin (Gesamtvolumen 20 µl) inkubiert (20 Minuten, RT). Im Anschluss wurden die Proben elektrophoretisch (110 V, 45 Minuten) über ein 8% TBE-Polyacrylamidgel in 0,5-fach TBE-Puffer (44,5 mM Tris, 44,5 mM Bohrsäure, 1 mM EDTA) aufgetrennt. Die Detektion des Fluoreszenzfarbstoffes Dyomics-781 erfolgte mit Hilfe des Odyssey Fc Imager der Firma Li-Cor Bioscience GmbH (Bad Homburg, DE) bei einer Wellenlänge von 800 nm.

9 Bioinformatik

Zur bioinformatischen Analyse der Verbreitung diverser Proteine wurde die Integrated Microbial Genome und Microbiome Database (IMG/M) des „U. S. Department of Energy (DOE) Joint Genome Institute“ [<http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi>] (Chen *et al.*, 2017a)] verwendet. Die Suche nach homologen Proteinen erfolgte dabei mit Hilfe des BLAST-P Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990). Als Ausgangssequenz dienten hierbei die Proteine GbsR, GbsA, OpuAC, OpuCC, OpuD und OpuE aus *B. subtilis* JH642. Für phylogenetische Analysen, wurden über die Funktion „Distance Tree“ Stämme identifiziert, für die 16S rDNA Informationen in der SILVA Datenbank vorlagen (Glöckner *et al.*, 2017). Diese wurden für die Konstruktion von phylogenetischen Stammbäumen mit Hilfe von iTOL [<https://itol.embl.de>] (Letunic und Bork, 2016)] verwendet. Die Bearbeitung der erhaltenen Stammbäume erfolgte mit Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems, San José, CA, USA). Vergleiche von Basen- und Aminosäuresequenzen erfolgten mit dem MAFFT Onlineprogramm [<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>] (Kato *et al.*, 2017)]. *In silico* Modelle von Proteinstrukturen wurden mit Hilfe des SWISS Model Servers [<https://swissmodel.expasy.org>] (Waterhouse *et al.*, 2018)] erstellt. Ihre Darstellung und Bearbeitung erfolgte mit dem Programm PyMOL [<http://pymol.org>] (Delano, 2002)].

V. Ergebnisse

10 Phylogenetische Verbreitung der Opu-Transporter und der Glycinbetain Synthese aus Cholin

Kompatible Solute werden von einer Vielzahl von *Bacteria* und *Archaea* als Schutz vor hyperosmotischen Bedingungen aufgenommen oder synthetisiert (Csonka und Hanson, 1991; da Costa *et al.*, 1998; Kempf und Bremer, 1998; Wood *et al.*, 2001; Roesser und Müller, 2001; Wood, 2011). Aus energetischen Gründen wird die Aufnahme hierbei bevorzugt (Oren, 1999). Um dies zu bewerkstelligen verfügt *B. subtilis* über fünf Import-Systeme (OpuA, OpuB, OpuC, OpuD, OpuE), die unterschiedlichen Transporter-Klassen zuzuordnen sind und sich in ihrem Substratspektrum unterscheiden (Hoffmann und Bremer, 2017).

Um eine Übersicht der Verbreitung der verschiedenen Transporter innerhalb der Gattung *Bacillus* zu erlangen, erfolgte eine bioinformatische Analyse. Die Suche in der Integrated Microbial Genome und Microbiome Database (IMG/M) des „U. S. Department of Energy (DOE) Joint Genome Institute“ (Chen *et al.*, 2017a) wurde hierbei auf einen Vertreter pro Spezies und solche, für die 16S rDNA Informationen in der SILVA Datenbank (Glöckner *et al.*, 2017) vorhanden waren beschränkt. Hieraus resultierte ein Datensatz von 175 Stämmen (Teichmann, 2018). Durch eine BLAST Analyse (Altschul *et al.*, 1990) innerhalb dieses Datensatz wurden Homologe der Transporter OpuA, OpuB, OpuC, OpuD und OpuE identifiziert. Hierbei wurden die Aminosäuresequenzen der Substratbindepoteine OpuAC und OpuCC, sowie der Proteine OpuD und OpuE verwendet. Bei der Suche mit der Aminosäuresequenz des OpuCC Proteins, konnten auf Grund der hohen Sequenzidentität (Kappes *et al.*, 1999), neben Homologen des OpuCC Proteins auch Homologe des OpuBC Proteins gefunden werden (Teichmann, 2018). Für die Zuordnung dieser Substratbindepoteine zu einem OpuB-Typ oder einem OpuC-Typ Transporter wurde ein Vergleich der Aminosäuresequenzen mit den entsprechenden Sequenzen aus *B. subtilis* vorgenommen. Für die Analyse der phylogenetischen Verteilung der verschiedenen Import Systeme wurde ein Stammbaum auf Basis der 16S rDNA Informationen der SILVA Datenbank (Glöckner *et al.*, 2017) mit Hilfe des Web-Tools iTOL (Letunic und Bork, 2016) erstellt (Abbildung 7).

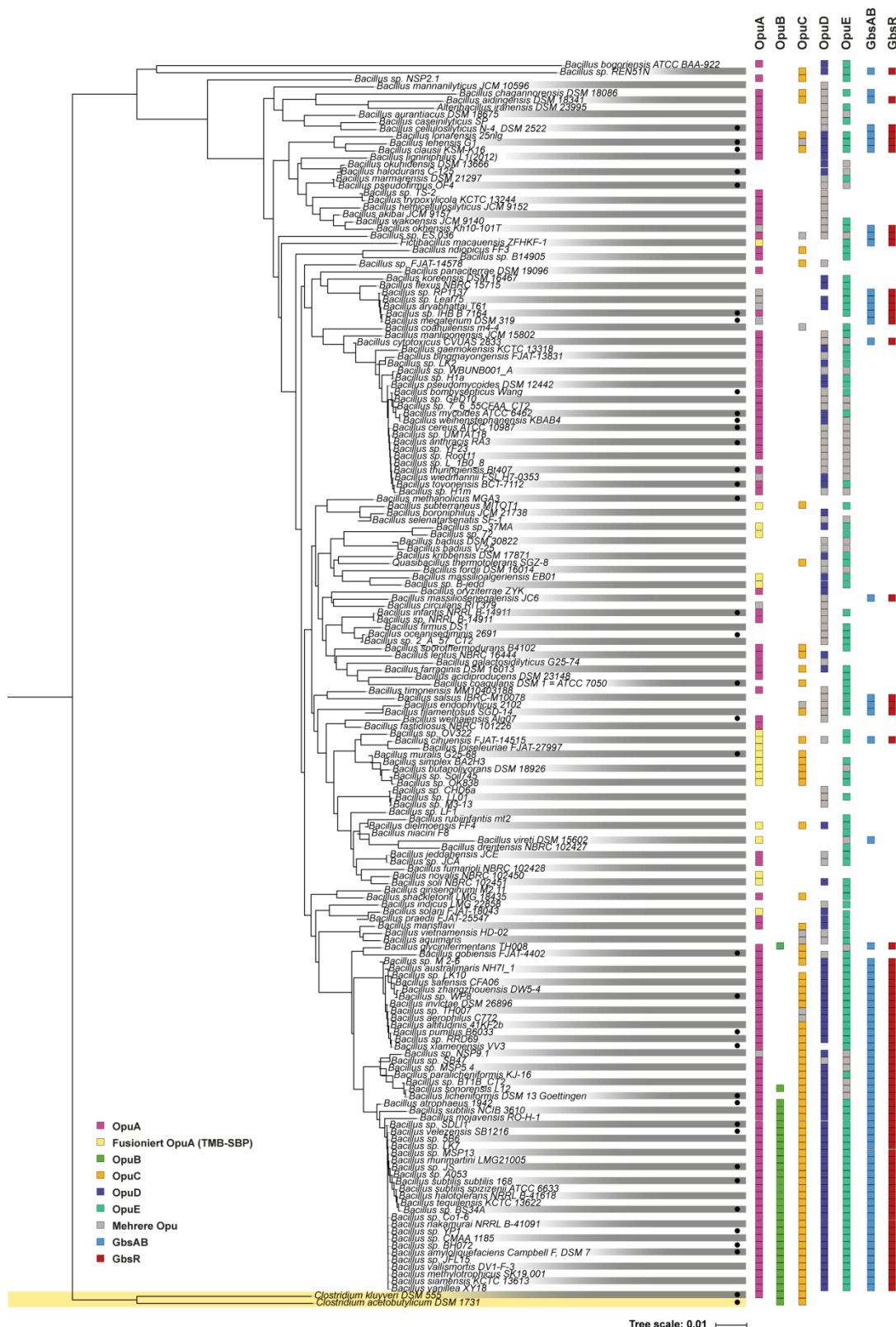


Abbildung 7 Phylogenetische Verbreitung der Opu-Transporter, sowie der Enzyme GbsAB des Glycinbetain Synthesewegs.

175 Stämme der Gattung *Bacillus*, für die 16S rDNA Daten in der SILVA Datenbank (Glöckner *et al.*, 2017) hinterlegt waren wurden mit Hilfe der IMG/M Datenbank (Chen *et al.*, 2017a) identifiziert. Dabei wurde die Suche auf einen Stamm pro Spezies beschränkt. Der phylogenetische Stammbaum wurde auf Basis von 16S rDNA Informationen konstruiert. Als „Outgroup“ dienten zwei Stämme der Gattung *Clostridium* (gelb). Vertreter mit vollständig sequenziertem Genom sind durch einen schwarzen Punkt markiert. Homologe der Transporter OpuA, OpuB, OpuC, OpuD und OpuE wurden durch eine BLAST Suche identifiziert. Ebenso wurde für die Suche nach Homologen der Glycinbetain synthetisierenden Enzyme GbsAB und des Regulators GbsR verfahren.

Aus dieser Analyse geht hervor, dass der ABC-Transporter OpuA (152 Homologe) und die Einzelkomponententransporter OpuD (350 Homologe) und OpuE (181 Homologe) etwa gleichmäßig im Genus *Bacillus* verteilt sind. Sie sind sowohl in evolutionär „alten“ als auch in evolutionär „jungen“ *Bacillus* Stämmen zu finden. Auffällig ist hierbei, dass in evolutionär „alten“ Stämmen mehrere Homologe des OpuD und des OpuE Transporters innerhalb eines Stammes vorliegen. Wie bereits durch L. Teichmann (Teichmann, 2018) beschrieben, lassen sich Homologe des OpuB Transporters (29 Homologe) nur innerhalb einer kleinen Gruppe „moderner“ *Bacillus* Stämme finden. Der nahe verwandte Transporter OpuC (81 Homologe) zeigt dagegen eine weitere Verbreitung, sowie ein früheres Auftreten. Transporter des OpuB-Typs kommen zudem ausschließlich in Stämmen vor, die auch über einen OpuC-Typ Transporter verfügen. Hierdurch konnte L. Teichmann die Hypothese untermauern, nach der die beiden Transporter vermutlich aus einer Genduplikation hervorgegangen sind (Kappes *et al.*, 1999; Teichmann, 2018).

Neben der Aufnahme von kompatiblen Soluten aus der Umwelt, ist *B. subtilis* in der Lage das weit verbreitete kompatible Solut Glycinbetain aus dem Vorläufer Cholin zu synthetisieren (Boch *et al.*, 1994; Boch *et al.*, 1996). Cholin wird über die Transporter OpuB und OpuC aufgenommen und durch die Enzyme GbsB und GbsA zu Glycinbetain oxidiert (Boch *et al.*, 1994; Boch *et al.*, 1996). Die Operone *opuB* und *gbsAB* stehen dabei unter der transkriptionellen Kontrolle des Cholin-abhängigen Repressors GbsR (Nau-Wagner *et al.*, 2012).

Die Verbreitung des GbsAB-GbsR Systems wurde durch eine BLAST Analyse, unter Verwendung der Aminosäuresequenzen der Proteine GbsA und GbsR bioinformatisch untersucht. Die entsprechenden Gennachbarschaften wurden evaluiert, um das Vorhandensein eines *gbsB* Gens in der direkten Nachbarschaft zu einem *gbsA* Gens sicher zu stellen. Für die Zuordnung eines Proteins als GbsR wurde ein direkt angrenzendes *gbsAB* Gencluster vorausgesetzt.

Nach diesen Kriterien konnten 70 Homologe von GbsAB und 68 Homologe von GbsR identifiziert werden (Abbildung 7). Diese sind vor allem in den „modernen“ *Bacillus* Stämmen zu finden, die auch über die Cholin-Transporter OpuB und OpuC verfügen. Darüber hinaus weist eine kleinere Gruppe von evolutionär „alten“ Stämmen an der Basis des Stammbaums ebenfalls Homologe der Glycinbetain synthetisierenden Enzyme GbsAB und des Regulators GbsR auf. Mit Ausnahme von *Bacillus vireti* DSM 15602 und *Bacillus chagannorensis* DSM 18086 weist die Gennachbarschaft der *gbsAB* Gencluster immer auch ein *gbsR* Gen auf (Abbildung 7). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass es sich bei diesen beiden Stämmen um Vertreter handelt, deren Genom nicht vollständig sequenziert wurde.

11 Intrazelluläre Akkumulation von Glycinbetain durch Aufnahme und Synthese

In vielen Mikroorganismen erfolgt die Synthese von Glycinbetain durch die enzymatische Oxidation des Vorläufermoleküls Cholin (Lamark *et al.*, 1991; Kempf und Bremer, 1998). Die bioinformatische Analyse aus Kapitel 10 zeigt eine weite Verbreitung dieser Strategie innerhalb der Gattung *Bacillus* wie bereits für *B. subtilis* beschrieben (Boch *et al.*, 1994; Boch *et al.*, 1996). Cholin selbst ist jedoch nicht osmoprotektiv. Stattdessen ist die protektive Funktion des importiertem Cholin von der Umwandlung zu Glycinbetain über die Enzyme GbsB und GbsA abhängig (Boch *et al.*, 1994; Boch *et al.*, 1996). Die Anhäufung von Cholin ist sogar schädlich für die Zellen, Grund hierfür ist vermutlich die hiermit verbundene große Anzahl an positiv geladenen Molekülen in der Zelle (Boch *et al.*, 1996). Ebenso toxisch ist die Anhäufung des chemisch hochgradig reaktiven Intermediats Glycinbetain Aldehyd, dessen Akkumulation durch die Glycinbetain Aldehyd Dehydrogenase verhindert wird (Boch *et al.*, 1996; Boch *et al.*, 1997).

Um die Effizienz der osmoadaptiven Glycinbetain Synthese in *B. subtilis* zu prüfen, wurden die intrazellulären Konzentrationen an Glycinbetain und Cholin mittels LC-ESI-MS in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Andreas Seubert (Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg, DE) bestimmt. Hierfür wurde der *B. subtilis* Stamm JH642 (Smith *et al.*, 2014) in SMM mit unterschiedlicher Osmolarität in Gegenwart von 1 mM der kompatiblen Solute Cholin oder Glycinbetain kultiviert. Zellen, die in Gegenwart von Glycinbetain kultiviert wurden, wiesen in SMM einen intrazellulären Glycinbetain Pool von 78 mM auf (Abbildung 8). In osmotisch gestresste Zellen konnte eine Erhöhung der intrazellulären Glycinbetain Konzentration auf 301 mM (SMM 0,4 M NaCl) bzw. 500 mM (SMM 1,2 M NaCl) verzeichnet werden (Abbildung 8). Dieser Befund stimmt mit den zuvor publizierten Pool-Größen überein, die von Hoffmann *et al.* mit Hilfe von radioaktiv markiertem Glycinbetain bestimmt wurden (Hoffmann *et al.*, 2013). Zellen, die in Anwesenheit von Cholin kultiviert wurden, zeigten vergleichbare intrazelluläre Glycinbetain Pools, wie diejenigen, die Glycinbetain aus dem Medium aufnehmen konnten. Des Weiteren konnte nicht umgesetztes Cholin in Konzentrationen von 10 mM (SMM) bis 30 mM (SMM 0,4 M NaCl) detektiert werden (Abbildung 8). Diese Daten zeigen, dass Cholin unter den untersuchten Wachstumsbedingungen fast vollständig zu Glycinbetain umgesetzt wird und die Zelle durch diesen effektiven Biosyntheseweg auf die gleiche Weise vor hohen Salinitäten protektiert werden kann, wie durch die Aufnahme von Glycinbetain aus dem umgebenden Medium. Die intrazelluläre Solut Konzentration wird dabei präzise an die Stärke des osmotischen Stresses angepasst.

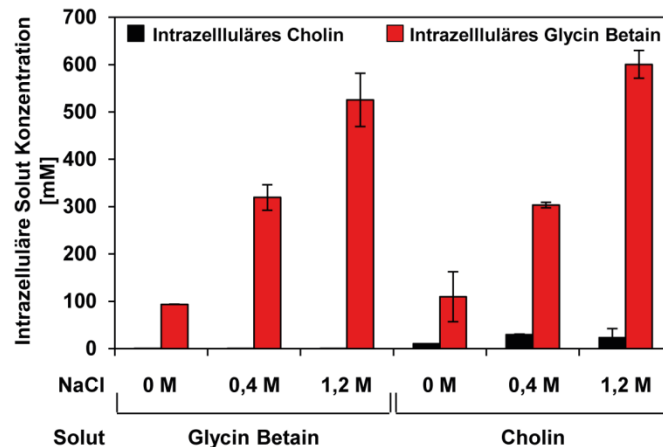


Abbildung 8 Intrazelluläre Pools von Glycinbetain und Cholin in *B. subtilis* unter osmotischem Stress.

B. subtilis JH642 wurde in SMM oder SMM mit 0,4 M bzw. 1,2 M NaCl in Anwesenheit von Glycinbetain oder Cholin (je 1 mM) bis zu einer OD₅₇₈ von 2-2,5 kultiviert. Zellextrakte wurden mit 80% (v/v) Ethanol angefertigt. Die enthaltenen Glycinbetain und Cholin Mengen wurden mit Hilfe von LC-ESI-MS bestimmt. Der Kontrollstamm TMB118 in dem die Gene der Transporter OpuA, OpuB, OpuC und OpuD deletiert wurden (Teichmann *et al.*, 2017) zeigte Pool-Größen zwischen 13 mM und 25 mM Glycinbetain. Diese Werte sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die unvollständige Entfernung von extrazellulär anhaftenden Glycinbetain während der Probenvorbereitung zurückzuführen, wodurch diese Werte von den Messungen des Wildtyp Stammes JH642 subtrahiert wurden.

12 GbsR – Regulator der Glycinbetain Synthese

12.1 Analyse der oligomeren Struktur des GbsR Proteins

Die Expression des *gbsAB*, sowie des *opuB* Operons wird durch den Repressor GbsR reguliert, einem Mitglied der MarR-Typ Familie transkriptioneller Regulatoren (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Proteine dieser Familie liegen typischerweise als Homodimere vor (Deochand und Grove, 2017). Dies ist auch der Fall für das Protein Mj223 aus *M. jannaschii*, auf Basis dessen Kristallstruktur das *in silico* Modell von GbsR erstellt wurde (Ray *et al.*, 2003; Nau-Wagner *et al.*, 2012). Eine Analyse der Quatärstruktur des GbsR Proteins konnte bisher auf Grund der geringen Stabilität des gereinigten Proteins nicht vorgenommen werden. Die vorläufigen Untersuchungen von S. Ronzheimer mittels Größenausschlusschromatographie legten nahe, dass das von ihr gereinigte Protein überwiegend in aggregierter Form vorlag (Ronzheimer, 2015).

Die Stabilität von Proteinen ist maßgeblich von dem verwendeten Puffer, dem pH-Wert und der Ionenstärke abhängig (Boivin *et al.*, 2013). Um Bedingungen zu identifizieren, die zu einer Stabilisierung des affinitätsgereinigten Proteins führen, wurde in Kooperation mit Dr. Sven-Andreas Freibert (AG Prof. Dr. R. Lill, Fachbereich Medizin, Universität-Marburg, DE) ein nano-Differential-Scanning-Fluorimetrieverfahren (nanoDSF) verwendet. Hierfür wurde GbsR wie von Nau-Wagner *et al.* beschrieben mit Hilfe von Strep-Tactin

Affinitätschromatographie aufgereinigt [100 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl (Nau-Wagner *et al.*, 2012)]. Als Maß für die Proteinstabilität wurde die Schmelztemperatur bestimmt. Diese entspricht der Temperatur, bei der die Hälfte des Proteins in entfalteter Form vorliegt (Boivin *et al.*, 2013). Auf diese Weise wurden 192 verschiedene Pufferzusammensetzungen getestet, wobei die oben genannten Faktoren variiert wurden. Eine Erhöhung der Schmelztemperatur des GbsR Proteins konnte in Anwesenheit von erhöhten NaCl-Konzentrationen, unabhängig von dem verwendeten Puffer und dem pH-Wert verzeichnet werden (Abbildung 48). Die Ionenstärke erscheint somit als Kritischer Wert für die Stabilität von GbsR. Aus diesem Grund wurde im Folgenden ein Puffer aus 100 mM KPP pH 8 und 300 mM NaCl eingesetzt.

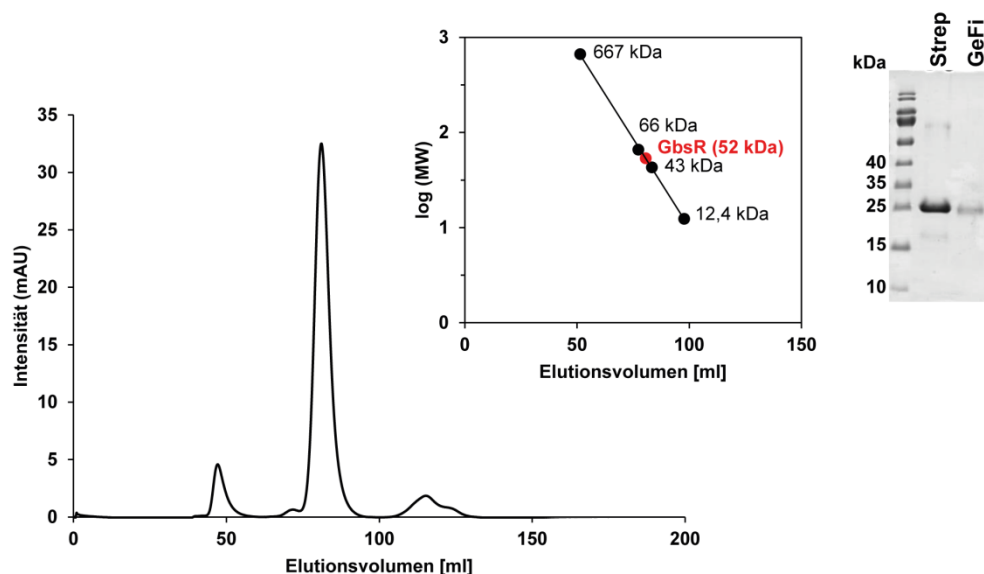


Abbildung 9 Größenausschlusschromatographie des GbsR Proteins aus *B. subtilis* und seine Analyse mittels SDS-Gel.

Unmittelbar nach der Reinigung des GbsR Proteins wurden 2 ml der Proteinlösung (1 mg ml^{-1}) auf eine Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg) aufgetragen. Der verwendete Puffer enthielt 100 mM KPP (pH 8) und 300 mM NaCl. Für die Kalibrierung der Säule wurden Thyroglobulin (667 kDa), Rinderserum Albumin (66 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Cytochrom C eines Pferdeherzens (12,4 kDa) als Referenzproteine verwendet. Die Reinheit, sowie die Molekularmasse von GbsR wurden im Anschluss an die Größenausschlusschromatographie mittels SDS-Gel (15%) analysiert.

Um sowohl die Bildung von Proteinaggregaten als auch die oligomere Struktur von GbsR zu untersuchen, wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Das Fusionsprotein aus GbsR und einem C-terminalen Strep-Tag® besitzt eine Größe von 22 kDa. Davon ausgehend, dass auch GbsR die für MarR-Typ Regulatoren typische quaternäre Struktur eines Dimers aufweist, ist eine Größe von 44 kDa zu erwarten. Unmittelbar nach erfolgter Reinigung des in *E. coli* überproduzierten GbsR Proteins wurden 2 ml einer Protein Lösung mit einer Konzentration von 1 mg ml^{-1} auf eine Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg) aufgetragen. Eine Kalibrierungsgerade wurde anhand der Referenzproteine

Thyroglobulin (667 kDa), Rinderserum Albumin (66 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Cytochrom C eines Pferdeherzens (12,4 kDa) erstellt (Abbildung 49). Innerhalb des Gelfiltrationslaufs von GbsR ließ sich ein dominanter Peak bei einem Elutionsvolumen von 81 ml erkennen, was einem errechneten Molekulargewicht des GbsR-Strep-Tag Proteins von etwa 52 kDa entspricht (Abbildung 9). Somit liegt das Protein vorwiegend als Dimer vor. Die Abweichung von 8 kDa zwischen dem erwarteten und dem experimentell bestimmten Molekulargewicht des GbsR Proteins lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass das Protein nicht perfekt globulär vorliegt. Ein kleinerer Peak ist bei einem Elutionsvolumen von 47 ml zu sehen (Abbildung 9). Dies entspricht einem Molekulargewicht von 943 kDa, was außerhalb des Fassungsvermögens der verwendeten Säule (≤ 250 kDa) liegt. Es handelt sich hierbei vermutlich um aggregiertes Protein.

12.2 Analyse des DNA-Bindemotivs von GbsR

Die DNA-Bindestellen von MarR-Typ Regulatoren überlappen häufig mit der Promotorsequenz der regulierten Gene. Sie blockieren üblicherweise den Zugang der RNA-Polymerase zum Promotor und agieren somit durch sterische Inhibition, jedoch wurden auch alternative Mechanismen der Repression durch MarR-Typ Proteine beschrieben (Galán *et al.*, 2003; Wilkinson und Grove, 2006; Deochand und Grove, 2017). Nau-Wagner *et al.* (2012) sagten sowohl für das *gbsAB* als auch das *opuB* Operon GbsR-Bindestellen innerhalb der regulatorischen Regionen vorher (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Hierbei wurde für das *gbsAB* Operon ein AT-reiches, palindromisches Bindemotiv stromabwärts des Transkriptionsstarts vorgeschlagen (Abbildung 10A). Ein identisches Bindemotiv wurde in der *opuB* Promotorregion festgestellt. Hier überlappt die vorgeschlagene Bindestelle mit der -35 Region des Promotors (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Somit wurde hier zuerst einmal davon ausgegangen, dass GbsR durch zwei unterschiedliche Mechanismen agiert um die Expression der Zielgene zu reprimieren.

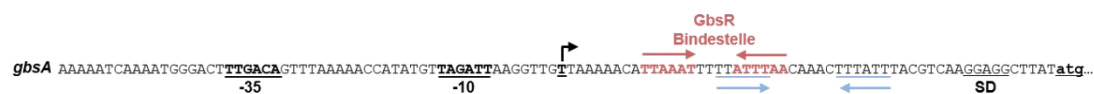
12.2.1 Analyse des DNA-Bindemotivs von GbsR in der regulatorischen Region des *gbsAB* Operons

Da die Vorhersage von Nau-Wagner *et al.* (2012) falsch war, konnte bereits durch Mutagenesestudien unter Verwendung einer *gbsA-treA* Reportergenfusion gezeigt werden (Ronzheimer, 2015) und im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Tabelle 11). Hierfür wurden mittels zielgerichteter Mutagenese Substitutionen innerhalb der rechten Hälfte des vermuteten palindromischen Bindemotivs eingeführt. Diese resultierten jedoch nicht in einer veränderten *gbsA-treA* Transkription. Wie bei Verwendung der Wildtyp-Fusion war eine GbsR-abhängige Induktion der *gbsA-treA* Expression durch Cholin zu erkennen

(Tabelle 11). Dadurch ist anzunehmen, dass es sich hierbei nicht um die GbsR-Bindestelle handelt.

Darüber hinaus gelang es S. Ronzheimer (2015) die GbsR-Bindestelle, ein AT-reicher „inverted repeat“, in der regulatorischen Region des *gbsAB* Operons durch *treA*-Reportergergenstudien zu identifizieren (Abbildung 10A). Ich konnte hier nun zeigen, dass dieses Bindemotiv in den Promotorregionen putativer *gbsAB* Gencluster innerhalb der Gattung *Bacillus* strikt konserviert ist (Abbildung 10B). Übereinstimmend mit den Vorhersagen von Nau-Wagner *et al.* (2012) ist die GbsR Operatorsequenz stromabwärts des Transkriptionsstarts gelegen, wodurch GbsR vermutlich als „Road-Block“ agiert (Bervoets und Charlier, 2019).

A



B

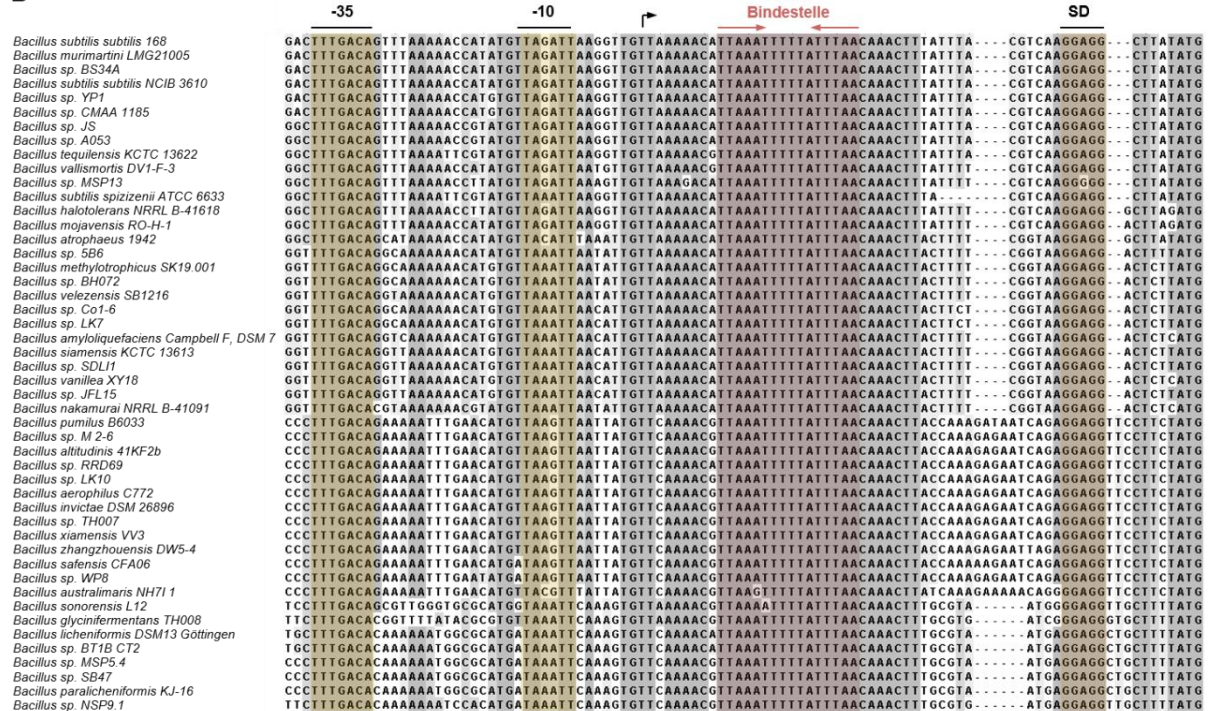


Abbildung 10 Die GbsR-Bindestelle innerhalb der Promotorregion des *gbsAB* Operons. (A) Dargestellt ist die Sequenz der *gbsAB* Promotorregion aus *B. subtilis*. Die von Nau-Wagner *et al.* (2012) vorhergesagte GbsR-Bindestelle ist durch blaue Pfeile dargestellt. Die durch S. Ronzheimer (2015) experimentell bestätigte Bindestelle ist durch rote Pfeile gekennzeichnet (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Ronzheimer, 2015). **(B)** Sequenzvergleich der *gbsAB* Promotorregionen innerhalb der Gattung *Bacillus*. Dargestellt sind die DNA-Sequenzen der *gbsAB* Promotorregionen. Die GbsR-Bindestelle ist durch rote Pfeile markiert. Zudem sind die -35 und die -10 Region des SigA-Typ Promotors [gelb (Boch *et al.*, 1996)], der Transkriptionsstart (gebogener Pfeil) und die Shine-Dalgarno Sequenz (SD, orange) hervorgehoben. Hochkonservierte Bereiche sind in grau schattiert.

Um zu demonstrieren, dass die identifizierte Basenabfolge der direkten Bindung des Repressors GbsR dient wurden Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs) angefertigt. Hierfür erfolgte die heterologe Expression des GbsR-Proteins mit Hilfe des Plasmids

pSTH02 in dem *E. coli* Stamm BL21 und die anschließende Aufreinigung des Proteins über Strep-Tag® Affinitätschromatographie (Abschnitt 8.5). Als DNA wurde entweder ein 96 bp langes PCR-Fragment der *gbsAB* Promotorregion verwendet oder ein Fragment der gleichen Region, das eine Deletion des GbsR-Bindemotivs trägt (Abbildung 11A). Die EMSA Studien wurden stets mit frisch gereinigtem Protein durchgeführt. Unter Verwendung des Wildtyp Fragments der regulatorischen Region des *gbsAB* Operons konnte eine direkte Interaktion zwischen DNA und Protein gezeigt werden (Abbildung 11B). Ab einem 4-fachen molaren Überschuss von GbsR im Vergleich zu dem DNA-Fragment wurde eine Bande oberhalb der freien DNA erkennbar. Hierbei handelt es sich um den GbsR:DNA Komplex, der größer als die freie DNA ist und somit langsamer im Gel läuft. Ab einem 15-fachen Überschuss war ausschließlich die obere Bande zu sehen. Die DNA wurde hier vollständig durch das Protein gebunden. Es konnte keine Interaktion zwischen GbsR und dem DNA-Fragment beobachtet werden, dessen GbsR-Bindestelle deletiert wurde (Abbildung 11C).

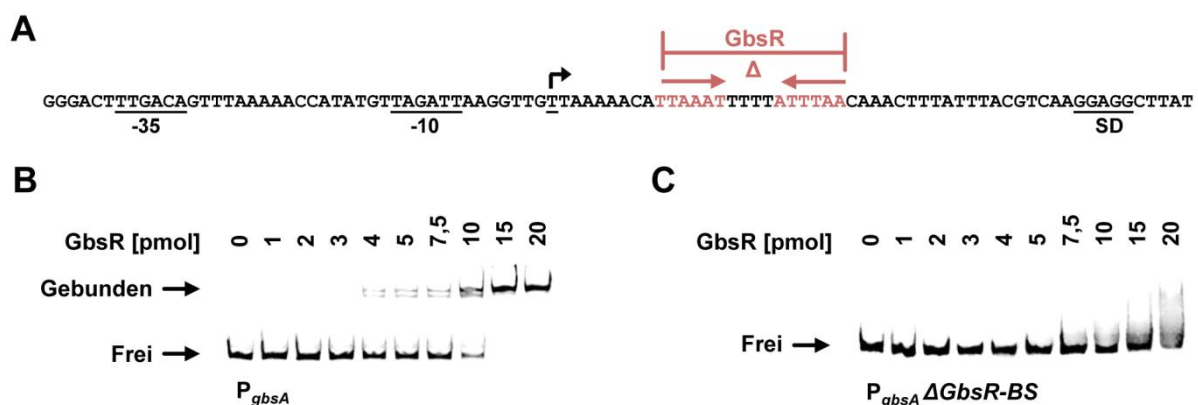


Abbildung 11 Analyse der GbsR-Bindestelle innerhalb der regulatorischen Region des *gbsAB* Operons. (A) Darstellung des 96 bp großen DNA-Fragments der *gbsAB* Promotorregion (P_{gbsA}). Die GbsR-Bindestelle ist rot markiert, der Bereich, der in dem DNA-Fragment P_{gbsA} ΔGbsR-BS deletiert wurde ist eingezeichnet. Für die EMSA Studien wurden unterschiedliche Mengen an frisch gereinigten GbsR (0-20-facher molare Überschuss) mit 1 pmol fluoreszenzmarkierter DNA, die (B) die GbsR-Bindestelle enthielt (P_{gbsA}) oder (C) eine Deletion der Bindestelle aufwies (P_{gbsA} ΔGbsR-BS) inkubiert. Der GbsR:DNA Komplex wurde elektrophoretisch mit Hilfe eines nativen 8% Polyacrylamidgels aufgetrennt.

12.2.2 Analyse des DNA-Bindemotivs von GbsR in der regulatorischen Region des *opuB* Operons

Neben dem *gbsAB* Operon steht auch das *opuB* Operon unter der negativen Kontrolle des MarR-Typ Regulators GbsR (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Um das DNA-Bindemotiv in der regulatorischen Region des *opuB* Genclusters zu identifizieren, wurde zunächst ein Vergleich der Promotorregionen des *gbsAB* und des *opuB* Operons angestellt. Hierbei zeigte sich eine Sequenz stromabwärts des *opuB* Transkriptionsstarts mit einer starker Ähnlichkeit zu dem identifizierten „inverted repeat“ vor dem *gbsAB* Operon (Ronzheimer, 2015). Die

linke Hälfte des Bindemotivs ist dabei strikt konserviert, während die rechte Hälfte in zwei Positionen Abweichungen aufweist (Abbildung 12).

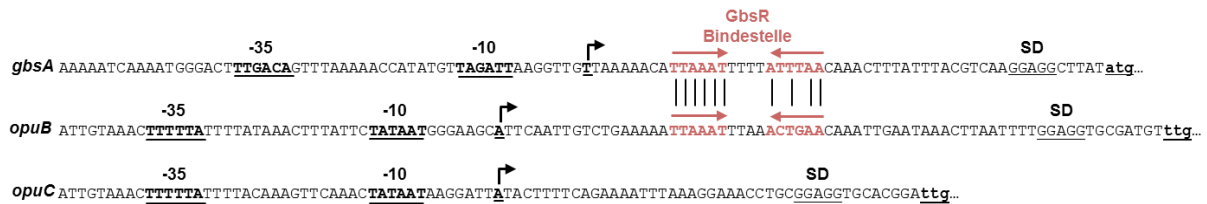


Abbildung 12 Die GbsR-Bindestellen in den regulatorischen Regionen des *gbsAB* und *opuB* Operons.

Dargestellt sind die Promotorregionen des *gbsAB*, *opuB* und *opuC* Operons. Die GbsR-Bindestelle ist durch rote Pfeile gekennzeichnet. Konservierte Basenpaare zwischen den GbsR-Bindestellen sind durch schwarze Striche markiert. Die -35 und die -10 Region der SigA Promotoren, der Transkriptionsstart (gebogener Pfeil) und die Shine-Dalgarno Sequenz (SD) sind hervorgehoben. Während die Transkriptionsstarts der *gbsAB* (Boch *et al.*, 1996) und der *opuB* (Kappes *et al.*, 1999) mRNA experimentell bestimmt wurden, wurde der Promotor des *opuC* Operons vorhergesagt (Nau-Wagner *et al.*, 2012).

Ebenso wie die GbsR-Operatorsequenz des *gbsAB* Operons ist auch die putative GbsR-Bindestelle des *opuB* Operons innerhalb der Gattung *Bacillus* hoch konserviert. Hierbei weisen die putativen GbsR-Bindestellen entweder exakt die Basenabfolge der GbsR Operatorsequenz von *gbsAB* (TTAAAT-4 bp-ATTTAA) oder die vorgeschlagene Sequenz für das *opuB* Operon aus *B. subtilis* (TTAAT-4 bp-ACTGAA) auf (Abbildung 13). Übereinstimmend mit dem Befund, dass GbsR in *B. subtilis* nicht an der Regulation des *opuC* Operons beteiligt ist (Nau-Wagner *et al.*, 2012), fehlt ein putatives GbsR-Bindemotiv in der entsprechenden Promotorregion (Abbildung 12).

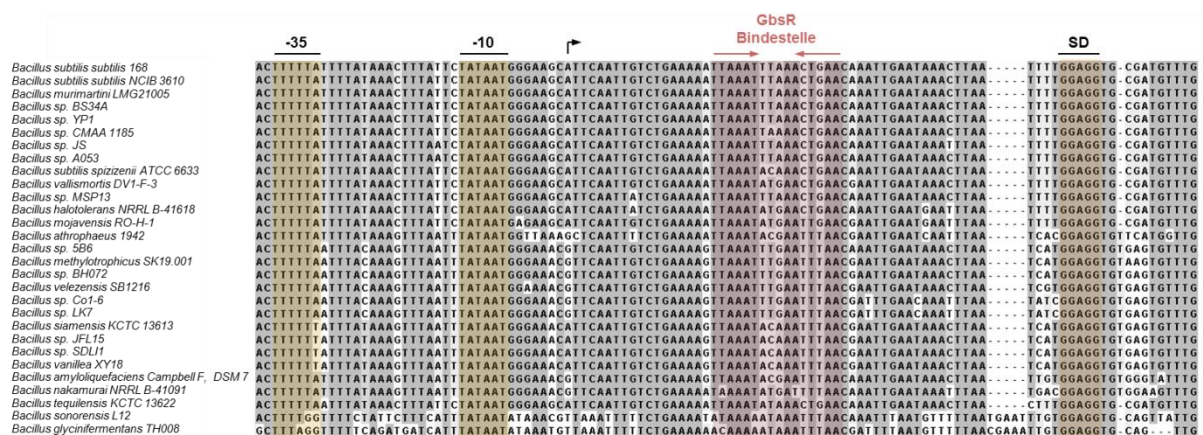


Abbildung 13 Sequenzvergleich der *opuB* Promotorregionen innerhalb der Gattung *Bacillus*.

Dargestellt sind die DNA-Sequenzen der *opuB* Promotorregionen. Die GbsR-Bindestelle ist durch rote Pfeile markiert. Die -35 und die -10 Regionen des SigA-Typ Promotors (Kappes *et al.*, 1999) sind gelb hinterlegt. Zudem sind der Transkriptionsstart (gebogener Pfeil) und die Shine-Dalgarno Sequenz (SD, orange) hervorgehoben. Hochkonservierte Bereiche sind in grau hinterlegt.

Um die putative GbsR-Bindestelle des *opuB* Operons zu analysieren wurde eine gerichtete Mutagenesestudie unter Verwendung einer *opuBA-treA* Reporterfusion durchgeführt. Anhand dieser Fusion wurden analog zu den Studien mit *gbsAB* Deletionen, Insertionen und Substitutionen innerhalb der vorhergesagten Operatorsequenz untersucht. Die entsprechenden *B. subtilis* Stämme wurden hierfür in SMM bis zum Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,25 kultiviert. Nach der Zugabe von 0,4 M NaCl (Endkonzentration) wurden die Kulturen für weitere 90 Minuten inkubiert. Zu beiden Zeitpunkten wurden Aliquots der Kulturen durch Zentrifugation geerntet und zur Bestimmung der TreA-Reporterenzym Aktivität verwendet. Die resultierenden Daten sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Zellen, die eine unmodifizierte *opuBA-treA* Reporterfusion trugen (STHB49) zeigten in SMM niedrige Expressionslevel von 27 ± 2 U mg Protein⁻¹, die in Gegenwart von 0,4 M NaCl um das 3-fache anstiegen. In einem Stamm, der neben der Reporterfusion eine Deletion des *gbsR* Gens aufweist (BWB23) konnten bereits in SMM deutlich erhöhte Expressionslevel (213 ± 26 U mg Protein⁻¹) bestimmt werden. Auch in Abwesenheit des Regulators GbsR war eine 2-fache Steigerung der Expressionslevel (373 ± 21 U mg Protein⁻¹) in Gegenwart von 0,4 M NaCl zu beobachten (Tabelle 10). Somit wird die *opuB* Transkription sowohl durch den Cholin-abhängigen Repressor GbsR, sowie unabhängig von diesem, durch steigende Salinität reguliert.

Alle Stämme, in denen das vorhergesagte Bindemotiv verändert wurde, zeigten unter ungestressten Bedingungen (SMM) eine Erhöhung der *opuBA-treA* Expressionslevel. Diese sind mit dem Niveau des Δ *gbsR* Stammes BWB23 vergleichbar. Eine Ausnahme hiervon stellten die Stämme BWB27 und BWB31 dar, in denen das Bindemotiv deletiert wurde. Hier waren im Vergleich zu den anderen Stämmen deutlich höhere Expressionslevel zu sehen. Mit 349 ± 2 U mg Protein⁻¹ und 457 ± 16 U mg Protein⁻¹ waren diese zudem 1,5- bis 2-fach so hoch wie die des Δ *gbsR* Stammes mit der Wildtyp *opuBA-treA* Fusion. Eine mögliche Ursache für die veränderten Expressionslevel in diesen Stämmen könnte, eine Beeinflussung des Supercoilings der DNA durch die eingeführte Deletion sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Supercoiling der DNA eine regulatorische Funktion in verschiedenen Bakterien einnimmt und die bakterielle Genexpression beeinflussen kann (Dorman und Dorman, 2016).

Da in Anwesenheit von GbsR alle analysierten Mutationen in der putativen GbsR Bindestelle einen deutlichen Einfluss auf die *opuB* Expression ausüben, handelt es sich bei der vorhergesagten Sequenz um das GbsR-Bindemotiv. Darüber hinaus ist festzuhalten, dass nicht nur die beiden Hälften des „inverted repeats“ für die Bindung von GbsR essentiell sind, sondern auch ihr Abstand zueinander als wichtig anzusehen ist.

Tabelle 10 Analyse der GbsR-Bindestelle von *opuB* durch Mutagenesestudien.

B. subtilis Stämme, die eine chromosomale Kopie der dargestellten *opuBA-treA* Reportergenfusion trugen, wurden in SMM bis zu einer OD₅₇₈ von 0,25 kultiviert. Aliquots dieser Kulturen wurden für die Bestimmung der TreA-Aktivität verwendet. Zu diesem Zeitpunkt wurde NaCl (Endkonzentration von 0,4 M) zu den Kulturen hinzugefügt. Nach einer weiteren Inkubation für 90 Minuten wurden Aliquots der Kulturen durch Zentrifugation geerntet und auf ihre TreA-Aktivität untersucht. Die putative GbsR-Bindestelle ist in rot dargestellt. Substitutionen und Insertionen in der vorhergesagten GbsR-Bindestelle sind in blau markiert. Deletionen innerhalb dieser Region sind durch gestrichelte Linien dargestellt.

Promotorregion Φ(<i>opuBA-treA</i>)	Stamm	<i>gbsR</i>	TreA-Aktivität [U (mg Protein) ⁻¹]	
			SMM	SMM 0,4 M NaCl
TGAAAAATTAATTTAACTGAACAAAT	STHB49	+	27 ± 2	77 ± 1
	BWB23	-	213 ± 26	373 ± 21
TGAAAAAT-----ACAAAT	BWB27	+	457 ± 16	710 ± 24
	BWB31	-	349 ± 2	559 ± 28
TGAAAA-----TTAACTGAACAAAT	BWB25	+	199 ± 1	477 ± 28
	BWB29	-	274 ± 25	498 ± 114
TGAAAAATTAATTTAA-----CAAT	BWB26	+	250 ± 4	459 ± 13
	BWB30	-	268 ± 21	438 ± 16
TGAAAAATTCCTTTAACTGAACAAAT	BWB33	+	217 ± 23	445 ± 57
	BWB35	-	241 ± 38	385 ± 31
TGAAAAATTAATTTTAACTGAACAAAT	BWB28	+	246 ± 5	398 ± 33
	BWB32	-	251 ± 0	337 ± 4
TGAAAAATTAAT--AACTGAACAAAT	BWB34	+	234 ± 80	452 ± 8
	BWB36	-	220 ± 4	327 ± 11

12.3 Analyse der Cholin-Bindetasche des GbsR Proteins

Der Cholin-abhängige Regulator GbsR bindet seinen Liganden mit einer K_D von 165 ± 15 µM (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu GbsR ist der Mechanismus der Ligandenbindung für die Cholin-Bindenden Proteine OpuBC (Pittelkow *et al.*, 2011) und OpuCC (Du *et al.*, 2011) aus *B. subtilis* sowie ChoX aus *Sinorhizobium meliloti* (Oswald *et al.*, 2008) bekannt. Diese Substratbindepoteine von ABC-Transportern weisen Cholin-Bindetaschen mit einem sich ähnelnden Aufbau aus vier aromatischen Aminosäureresten auf, die in der Form eines „aromatic cages“ arrangiert sind (Abbildung 14ABC). Ein solches Arrangement von aromatischen Aminosäureresten ist ein gemeinsames Kennzeichen von Substratbindepoteinen, die mit ABC-Transportern für kompatible Solute assoziiert sind (Schiefner *et al.*, 2004b; Horn *et al.*, 2006; Smits *et al.*, 2008; Oswald *et al.*, 2008; Wolters *et al.*, 2010; Du *et al.*, 2011; Pittelkow *et al.*, 2011; Lang *et al.*, 2015). Durch das elektronegative

Oberflächenpotential der Seitenketten aromatischer Aminosäuren werden positiv geladene Kopfgruppen, wie die Trimethylammoniumgruppe des Cholins, über Kationen- π Interaktion gebunden (Oswald *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2011; Pittelkow *et al.*, 2011). Um eine potentielle Cholin-Bindetasche im Regulator GbsR zu identifizieren, wurde ein *in silico* Modell des GbsR Proteins (Nau-Wagner *et al.*, 2012) auf Basis des *M. jannaschii* Proteins Mj223 (Ray *et al.*, 2003) angefertigt (Abbildung 13D). Dieses wurde mit den Kristallstrukturen der Substratbindeproteine OpuBC (Pittelkow *et al.*, 2011), OpuCC (Du *et al.*, 2011) und ChoX (Oswald *et al.*, 2008) im Komplex mit ihrem Liganden Cholin (Abbildung 13ABC) verglichen. Hierbei ist eine Häufung von sechs Phenylalaninresten (F⁹⁵, F⁹⁶, F⁹⁸, F⁹⁹, F¹⁰², F¹⁰³) auffällig, die angrenzend an die Linkerregion des GbsR Proteins zwischend der DNA-Bindedomäne und der Dimerisierungsdomäne lokalisiert sind (Abbildung 4) und möglicherweise eine Aromatenbindetasche bilden (Abbildung 14D). Zusätzlich ist ein Tryptophan (W¹⁰⁷) in der Nähe dieser Region zu finden, dass an der Cholinbindung beteiligt sein könnte (Abbildung 14D). Es ist zu beachten, dass das Mj223 Protein aus *M. jannaschii* (Ray *et al.*, 2003), auf dessen Kristallstruktur das GbsR *in silico* Model beruht nicht über eine solche Region mit aromatischen Aminosäuren verfügt (Abbildung 52). Aus diesem Grund lässt sich die räumliche Orientierung der aromatischen Seitenketten in GbsR durch das Strukturmodell (Abbildung 14D) nicht zuverlässig vorhersagen.

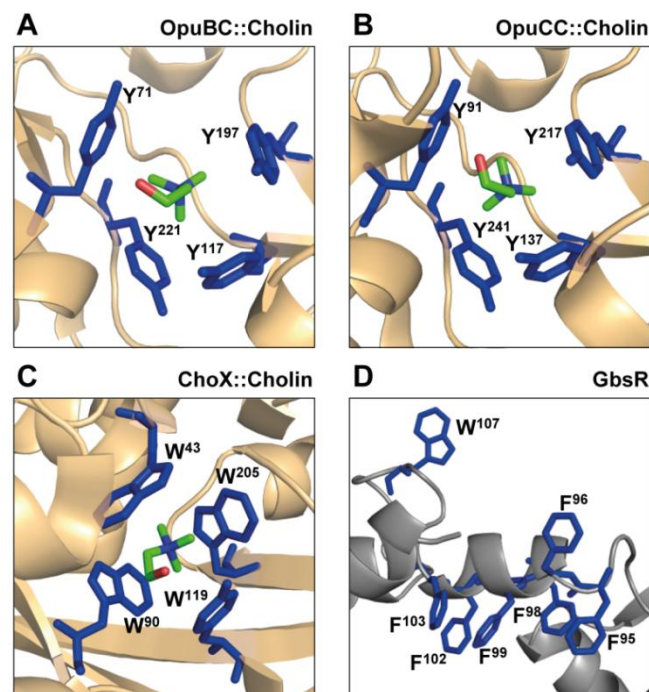


Abbildung 14 Vergleich der Cholin-Bindetaschen der Substratbindeproteine OpuBC, OpuCC und ChoX mit GbsR.

Dargestellt sind die Kristallstrukturen der Cholin-bindenden Proteine **(A)** OpuBC aus *B. subtilis* [PDB 3R6U (Pittelkow *et al.*, 2011)], **(B)** OpuCC aus *B. subtilis* [PDB 9PPQ (Du *et al.*, 2011)] und **(C)** ChoX aus *S. meliloti* [PDB 2REG (Oswald *et al.*, 2008)] mit ihrem Liganden Cholin (grün). **(D)** *In silico* Modell des GbsR Proteins aus *B. subtilis* basierend auf der Kristallstruktur des DNA-bindenden Proteins Mj223 aus *M. jannaschii* [PDB 1KU9 (Ray *et al.*, 2003)]. Aminosäuren die an der Bindung von Cholin beteiligt sind, sind in blau hervorgehoben.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der zuvor bioinformatisch identifizierten GbsR Proteine zeigt, dass diese Aminosäuren stark konserviert sind. Während an den Positionen 96, 98 und 103 relativ zu GbsR aus *B. subtilis* Abweichungen zu finden sind, handelt es sich bei F⁹⁵, F⁹⁹, F¹⁰² und W¹⁰⁷ um strikt konservierte Aminosäurereste (Abbildung 50). An Position 103 ist hierbei in vier Fällen alternativ zu einem Phenylalanin, die ebenfalls aromatische Aminosäure Tyrosin zu finden. An den Positionen 96 und 98 weisen einige putative GbsR Proteine anstelle einer aromatischen Aminosäure, ein Serin auf (Abbildung 50).

12.3.1 Mutagenesestudie der putativen Cholin-Bindetasche des GbsR Proteins

Um die Beteiligung der aromatischen Aminosäurereste F⁹⁵, F⁹⁶, F⁹⁸, F⁹⁹, F¹⁰², F¹⁰³ und W¹⁰⁷ des Repressors GbsR an der Bindung von Cholin zu untersuchen wurde ein *in vivo* Ansatz gewählt. Hierfür wurde ein Plasmid welches das *gbsR* Gen unter der Kontrolle seines natürlichen Promotor trägt (pLT5) in den chromosomalen *ytol* Locus des *B. subtilis* Stammes DHB12 (*gbsA-treA*; Δ *gbsR*) integriert. Über Zielgerichtete Mutagenese wurden Derivate des Plasmids pLT5 generiert, die für GbsR Varianten mit Aminosäureaustauschen in der putativen Cholin-Bindebox kodieren. Der Austausch der Aminosäuren erfolgte jeweils durch einen Alanin- (Abbildung 15A), Lysin- (Abbildung 15B), Arginin- (Abbildung 15C) und Glutaminsäurerest (Abbildung 15D). Die GbsR-abhängige *gbsA-treA* Reportergenfusion wurde verwendet, um die Induktion der Genexpression in Gegenwart des Induktors Cholin zu bestimmen. Hierfür lassen sich drei mögliche Szenarien vorhersagen: (I) Für GbsR Varianten, die die Cholin-Bindung negativ beeinflussen, wird eine reduzierte oder fehlende Induktion der *gbsA-treA* Expression in Gegenwart des Induktors erwartet, während (II) gleichbleibende Expressionslevel eine unveränderte Affinität des GbsR Proteins gegenüber Cholin vermuten lassen. (III) Eine dereprimierte Expression der *gbsA-treA* Reportergenfusion zeigt ein GbsR Protein an, das seine Fähigkeit zur DNA-Bindung verloren hat.

Die Konstruktion der diversen *B. subtilis* Stämme mit Varianten des *gbsR* Gens, ihre Kultivierung sowie die Bestimmung der *gbsA-treA* Transkriptionslevel wurde im Rahmen einer von mir betreuten Bachelorarbeit durch Marianne Fischer durchgeführt (Fischer, 2017). Hierfür wurden die Diversen *B. subtilis* Stämme in SMM bis zu einer OD₅₇₈ von 0,25 kultiviert. Aliquots der Kulturen wurden durch Zentrifugation geerntet und die Expression der *gbsA-treA* Reportergenfusion durch die Zugabe von 0,4 M NaCl und 1 mM Cholin (Endkonzentrationen) induziert. Nach einer weiteren Inkubation über 90 Minuten wurden erneut Aliquots entnommen und es erfolgte die Bestimmung der TreA-Aktivitäten (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Als Kontrollen wurden jeweils die Stämme DHB4 (WT), DHB12 (Δ *gbsR*), BWB70 (Δ *gbsR*; *ytol::gbsR_{WT}*) der eine Wildtyp Kopie des *gbsR* Gens im *ytol* Locus trägt und BWB71 (Δ *gbsR*; *ytol::pBB287*), der das für die Integration verwendete Leerplasmid im *ytol* Locus trägt

mitgeführt. In der Wildtyp Situation erfolgt eine Induktion der *gbsA-treA* Expression nach der Zugabe von NaCl und Cholin, während der *gbsR* Deletionsstamm eine dereprimierte Expression zeigte [Abbildung 15 (Nau-Wagner *et al.*, 2012)]. Dieser Phänotyp konnte durch die Integration des *gbsR* Wildtyp Gens komplementiert werden (Abbildung 15). Dabei wiesen die Stämme, die über den GbsR Repressor verfügen unter induzierten Bedingungen (0,4 M NaCl, 1 mM Cholin) geringere Expressionslevel auf als der *gbsR* Deletionsstamm (Abbildung 15). Dies ist verständlich, da durch die Expression des *gbsAB* Operons Cholin intrazellulär zu Glycinbetain umgewandelt wird, was dazu führt, dass die Transkription der Glycinbetain Synthese Gene GbsR-abhängig reprimiert wird (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Diese negative Rückkopplung ist in Abwesenheit von GbsR nicht möglich, wodurch erhöhte Transkriptionslevel zu beobachten sind.

Für die verschiedenen GbsR Varianten konnten in der Tat die drei Vorhergesagten Expressionsmuster bestimmt werden (Abbildung 15). Besonders auffallend waren hierbei diejenigen Aminosäureaustausche, die die Positionen F⁹⁵ und W¹⁰⁷ betreffen. Eine Veränderung der Position 95 führte in jedem Fall zu einem kompletten Verlust der *gbsA-treA* Expression in Antwort auf Cholin (Abbildung 15). Da hier die Bindung von Cholin vermutlich vollständig verhindert wird, ist der Phenylalaninrest an Position 95 des GbsR Proteins als essentiell für die Bindung des Ligande Cholin zu betrachten.

Alle Aminosäureaustausche, die an Position 107 vorgenommen wurden führten zu einer dereprimierten Expression der *gbsA-treA* Reporterfusion, wie sie auch für den *gbsR* Deletionsstamm zu beobachten ist (Abbildung 15). Hieraus lässt sich schließen, dass die Konformation des Proteins unabhängig von den physikalischen Eigenschaften der eingesetzten Aminosäure beeinflusst wird. Eine Aussage über die Beteiligung von W¹⁰⁷ an der Bindung von Cholin ist somit nicht möglich. Ähnliches konnte auch für die Veränderung der Aminosäure an Position 99 beobachtet werden. Hier wird ausschließlich der Austausch des Phenylalanins gegen ein Alanin mit kleiner unpolarer Seitenkette toleriert. Hierbei kam es zu keiner Veränderung in den *gbsA-treA* Transkriptionsleveln (Abbildung 15A). Die Einführung einer Aminosäure mit positiv oder negativ geladener Seitenkette an dieser Position verhindert die DNA-Bindung des GbsR Repressors (Abbildung 15BCD). Generell ist jedoch ersichtlich, dass durch einen Glutamatrest mit negativ geladener, hydrophiler Seitenkette innerhalb der putativen Cholin-Bindetasche vermutlich eine strukturelle Veränderung des Proteins stattfindet, wodurch eine Bindung der DNA unmöglich gemacht wird (Abbildung 15D).

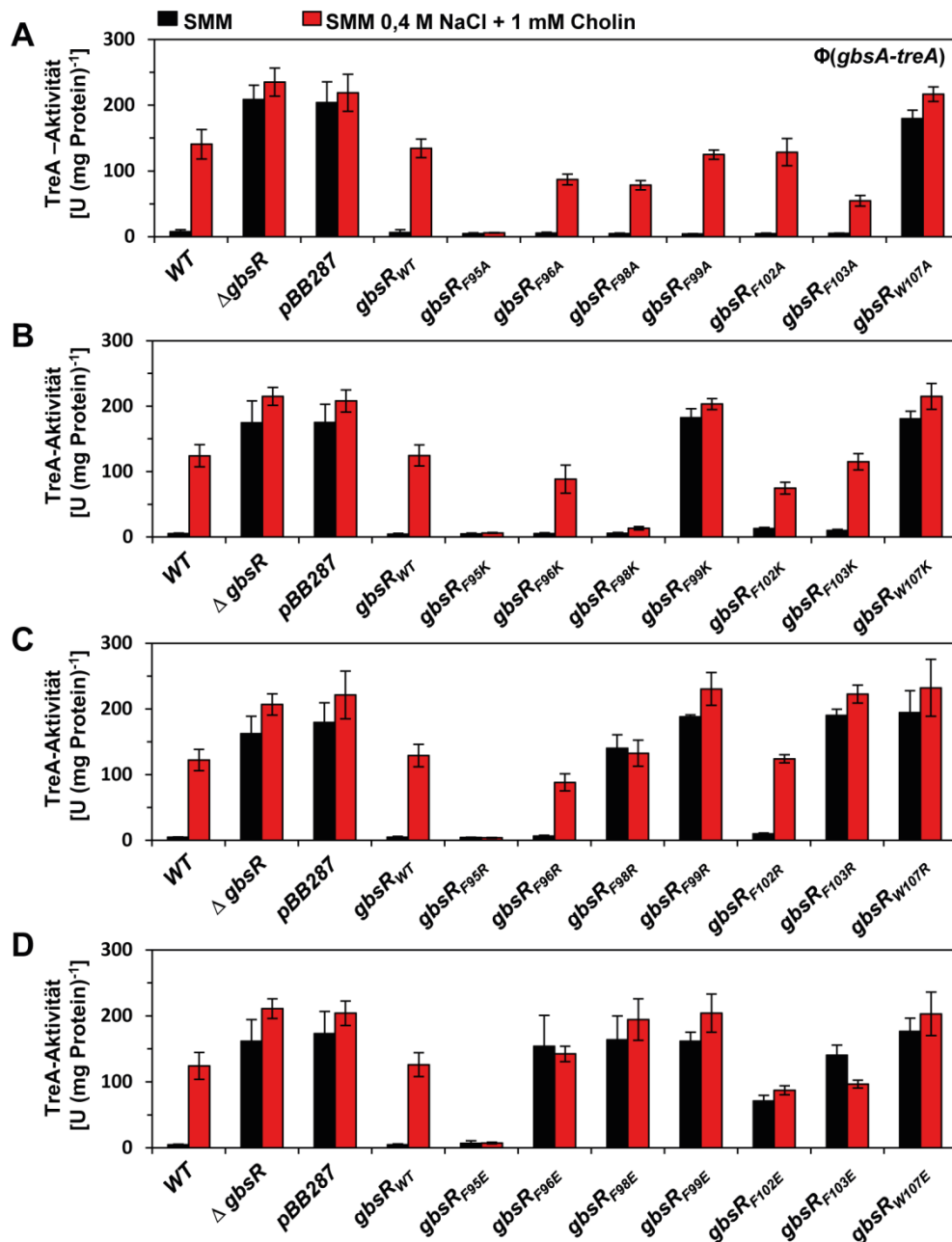


Abbildung 15 Analyse der putativen Ligandenbindetasche des Regulators GbsR.

Mutierte Varianten des *gbsR* Gens wurden in den *ytol* Locus des *B. subtilis* Stammes DHB12 (*gbsA-treA*; $\Delta gbsR$) integriert. Die resultierenden Stämme wurden in SMM bis zu einer OD_{578} von 0,25 kultiviert. Aliquots der Kulturen wurden für die Bestimmung der TreA-Aktivität geerntet. 0,4 M NaCl (Endkonzentration) und 1 mM Cholin (Endkonzentration) wurden den Kulturen zugesetzt. Nach einer weiteren Inkubation für 90 Minuten wurden die Zellen in einem TreA-Aktivitätsassays eingesetzt.

Ein negativer Einfluss auf die DNA-Bindung konnte auch durch die Anwesenheit eines Argininrests, mit positiv geladener Seitenkette an den Positionen 98 und 103 beobachtet werden (Abbildung 15C).

Hierbei scheint nicht nur die positive Ladung die Ursache zu sein, sondern auch die Größe der Seitenkette. Ein Austausch gegen einen Lysinrest, der ebenfalls eine positiv geladene Seitenkette aufweist, im Vergleich zu Arginin jedoch kleiner ist, zeigte an Position 103 keinen

Einfluss auf die Bindung von DNA oder Cholin (Abbildung 15B). Ein Lysin an Position 98 ließ keine Induktion der *gbsA-treA* Expression mehr zu, was darauf hindeutet, dass der Induktor Cholin nicht mehr gebunden werden kann (Abbildung 15B). Eine Beteiligung der Aminosäuren F⁹⁶, F⁹⁸, F¹⁰² und F¹⁰³ an der Cholin-Bindung konnte durch verringerte Induktionslevel der *gbsA-treA* Expression in Gegenwart von Cholin impliziert werden. Diese ließen sich entweder bei der Einführung einer kleinen Seitenkette wie im Fall von Alanin (Abbildung 15A) oder einer positiven Ladung (Abbildung 15BC) beobachten. Zusammenfassend ist durch die Mutagenesestudie eine Beteiligung der Phenylalaninreste der Positionen 95, 96, 98, 102 und 103 an der Liganden-Bindung zu erkennen.

12.3.2 GbsR Varianten, die die Cholin-Bindung beeinflussen zeigen einen dominant-negativen Phänotyp

Um zu überprüfen, ob die Anwesenheit des nativen *gbsR* Gens in der Lage ist, die phänotypischen Auswirkungen der GbsR Varianten zu komplementieren, wurden ausgewählte Varianten des *gbsR* Gens in den *ytoI* Locus des *B. subtilis* Stammes DHB4 (*gbsA-treA*) integriert und wie zuvor beschrieben kultiviert. Als Vertreter für GbsR Variante, die keine *gbsA-treA* Expression mehr zulassen wurden die Varianten GbsR⁹⁵F/R, GbsR⁹⁵F/K, GbsR⁹⁵F/R und GbsR⁹⁸F/K verwendet. Die GbsR Varianten GbsR⁹⁶F/K und GbsR¹⁰⁷W/K wurden exemplarisch für GbsR Proteine verwendet, die zu einer geringeren *gbsA-treA* Expression führen oder eine dereprimierte Expression zeigen. Als Kontrolle wurde zudem eine Wildtyp Kopie des *gbsR* Gens in das Chromosom von DHB4 (*gbsA-treA*) integriert. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass eine zweite Kopie des regulatorischen Gens keinen Einfluss auf die *gbsA-treA* Transkriptionslevel ausübt (Abbildung 16).

Während GbsR¹⁰⁷W/K in Abwesenheit des nativen *gbsR* Gens zu einer dereprimierten Expression führt, ließ sich dies durch die Anwesenheit des nativen *gbsR* komplementieren (Abbildung 16). Hier bleibt jedoch zu klären, welchen Einfluss der Austausch des Tryptophans an Position 107 gegen ein Lysin auf das Protein hat. Denkbar wären eine Beeinträchtigung der DNA-Bindung, ein Einfluss auf die Dimerisierung oder aber ein negativer Einfluss auf die generelle Struktur des Proteins.

Im Kontrast zu GbsR¹⁰⁷W/K konnte der Phänotyp der anderen GbsR Varianten nicht durch das native *gbsR* komplementiert werden. Im Fall von GbsR Proteinen mit Veränderungen in den Positionen 95 und 98 konnte auch hier keine Induktion der *gbsA-treA* Transkription in Gegenwart von Cholin beobachtet werden. Auch die verringerte Induktion im Fall von GbsR⁹⁶F/K blieb in Gegenwart einer *gbsR* Wildtypkopie unverändert (Abbildung 16). Somit agieren die getesteten GbsR Varianten mit fehlender oder verringerter Induktionsfähigkeit als dominant-negative Superrepressoren.

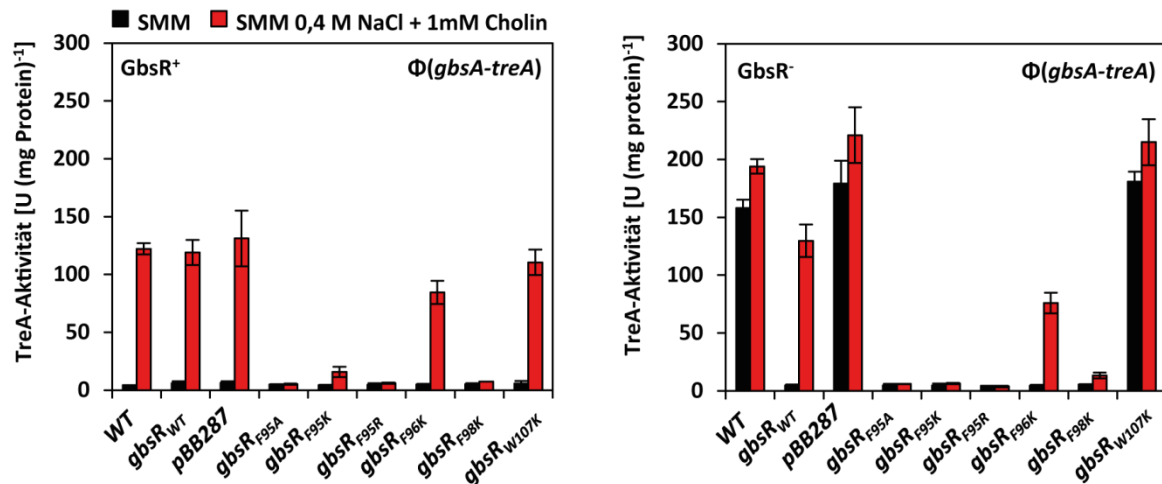


Abbildung 16 Dominant-negativer Phänotyp von GbsR Varianten.

Varianten des *gbsR* Gens wurden in den *ytol* Locus der *B. subtilis* Stämme DHB12 (*gbsA-treA*; $\Delta gbsR$) und DHB4 (*gbsA-treA*) integriert. Die resultierenden Stämme wurden in SMM bis zu einer OD₅₇₈ von 0,25 kultiviert. An diesem Punkt wurden den Kulturen NaCl (0,4 M Endkonzentration) und Cholin (1 mM Endkonzentration) zugesetzt. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 90 Minuten. Zu beiden Zeitpunkten wurden Aliquots der Kulturen für die Bestimmung der TreA-Aktivität durch Zentrifugation geerntet.

12.3.3 Analyse der strukturellen Integrität der GbsR Varianten

Um auszuschließen, dass die in Abschnitt 12.3.1 und 12.3.2 beobachteten Effekte in der Cholin- und DNA-Bindung der verschiedenen *GbsR* Varianten auf fehlgefaltete oder aggregierte Proteine zurückzuführen sind, wurden sowohl die Löslichkeit als auch die oligomere Struktur ausgewählter *GbsR* Varianten exemplarisch analysiert. Hierfür erfolgte die heterologe Expression der *GbsR* Proteine in dem *E. coli* Stamm BL21 unter Verwendung der Plasmide pSTH02 (*GbsR*_{WT}), pLT29 (*GbsR*^{96F/K}), pLT30 (*GbsR*^{95F/A}), pBW39 (*GbsR*^{107W/R}) und pBW40 (*GbsR*^{103F/R}). Im Anschluss an eine Strep-Tag Affinitätschromatographie wurde die molekulare Masse der Proteine mittels Größenausschlusschromatographie bestimmt.

Die *GbsR* Varianten *GbsR*^{107W/R} und *GbsR*^{103F/R} ließen sich heterolog Produzieren (Abbildung 17AB), jedoch nicht aufreinigen. Aus diesem Grund wurde die Löslichkeit dieser Proteine mittels SDS-Gel analysiert. Nach erfolgreichem Zellaufschluss wurden Membrantrümmer sowie unlösliche Proteine durch Zentrifugation aus dem Lysat entfernt und Proben von Lysat und Pellet wurden auf einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Während im Fall des *GbsR* Wildtyp Proteins deutliche Banden bei der erwarteten molekularen Masse von 22 kDa in der Fraktion des Lysats erkennen ließen, zeigten hier beide Mutanten nur eine schwache Bande. Eine deutlich markantere Bande war jedoch bei den Proben der Pellets zu erkennen (Abbildung 17AB). Dies lässt den Schluss zu, dass beide Aminosäureaustausche die Gesamtstruktur des Proteins negativ beeinflussen so, dass diese aggregieren und als unlösliches Protein ausfallen. Vor diesem Hintergrund müssen all

die GbsR Varianten, die zu einem Verlust der DNA-Bindeaktivität führen (Abbildung 15) kritisch betrachtet werden. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine Gruppe von Proteinen, die in ihrer Löslichkeit beeinträchtigt sind. Bei der in Abschnitt 12.3.2 beschriebenen Komplementation des Phänotyps der GbsR Variante GbsR¹⁰⁷W/K (Abbildung 16) könnte es sich somit um einen Trugschluss handeln, der daraus resultiert, dass ausschließlich das native GbsR löslich in der Zelle vorliegt.

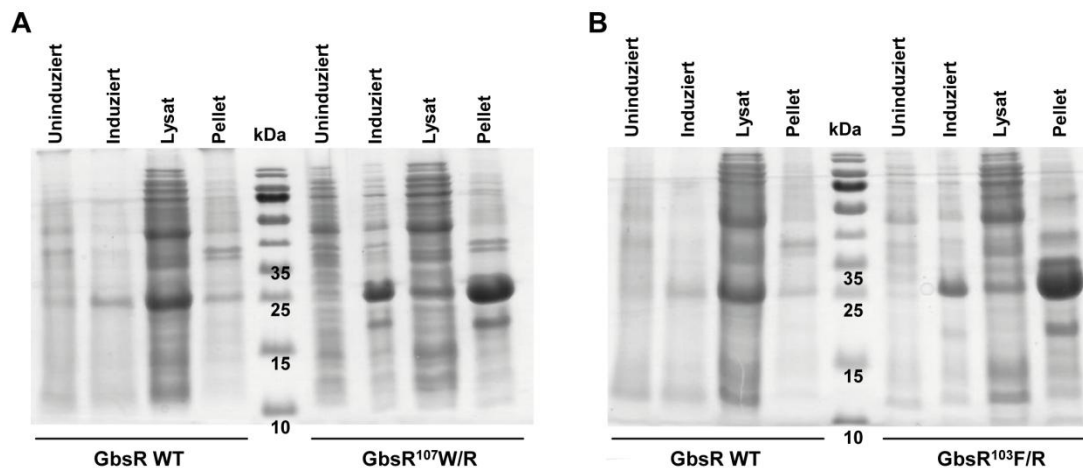


Abbildung 17 Analyse der Löslichkeit der GbsR Varianten GbsR¹⁰⁷W/R und GbsR¹⁰³F/R.

Die Löslichkeit des GbsR Wildtyp Proteins sowie dessen Varianten GbsR¹⁰⁷W/R und GbsR¹⁰³F/R wurde mit Hilfe von SDS-Gelen analysiert. Die heterologe Produktion der Proteine erfolgte in dem *E. coli* Stamm BL21 unter Verwendung der Plasmide pSTH02 (WT), pBW39 (GbsR¹⁰⁷W/R) und pBW40 (GbsR¹⁰³F/R). Die Zellen wurden in Lysepuffer resuspendiert und durch mehrmaliges Passagieren durch eine Frech Press Zelle aufgeschlossen. Die Proben wurden zentrifugiert. Der Überstand (Lysat) sowie das Pellet wurden im Anschluss mit Hilfe eines SDS-Gels (15%) elektrophoretisch aufgetrennt.

Im Gegensatz zu GbsR¹⁰⁷W/R und GbsR¹⁰³F/R erlaubte GbsR⁹⁶F/K eine Transkription der *gbsA-treA* Reportergenfusion nur in Gegenwart von Cholin, dies jedoch auf einem geringeren Level als im Wildtyp-Hintergrund (Abbildung 15B). Die Anwesenheit von GbsR⁹⁵F/A erlaubte keine Induktion der *gbsA-treA* Expression durch Cholin (Abbildung 15A). In beiden Fällen wird hierfür eine intakte Struktur des Proteins vorausgesetzt.

Um dies experimentell zu bestätigen wurden Größenausschlussexperimente mit den gereinigten Proteinen durchgeführt. Hierbei zeigte sich sowohl für GbsR⁹⁵F/A (Abbildung 18A) als auch für GbsR⁹⁶F/K (Abbildung 18B) ein ähnliches Chromatogramm wie für das GbsR Wildtyp Protein (Abbildung 9).

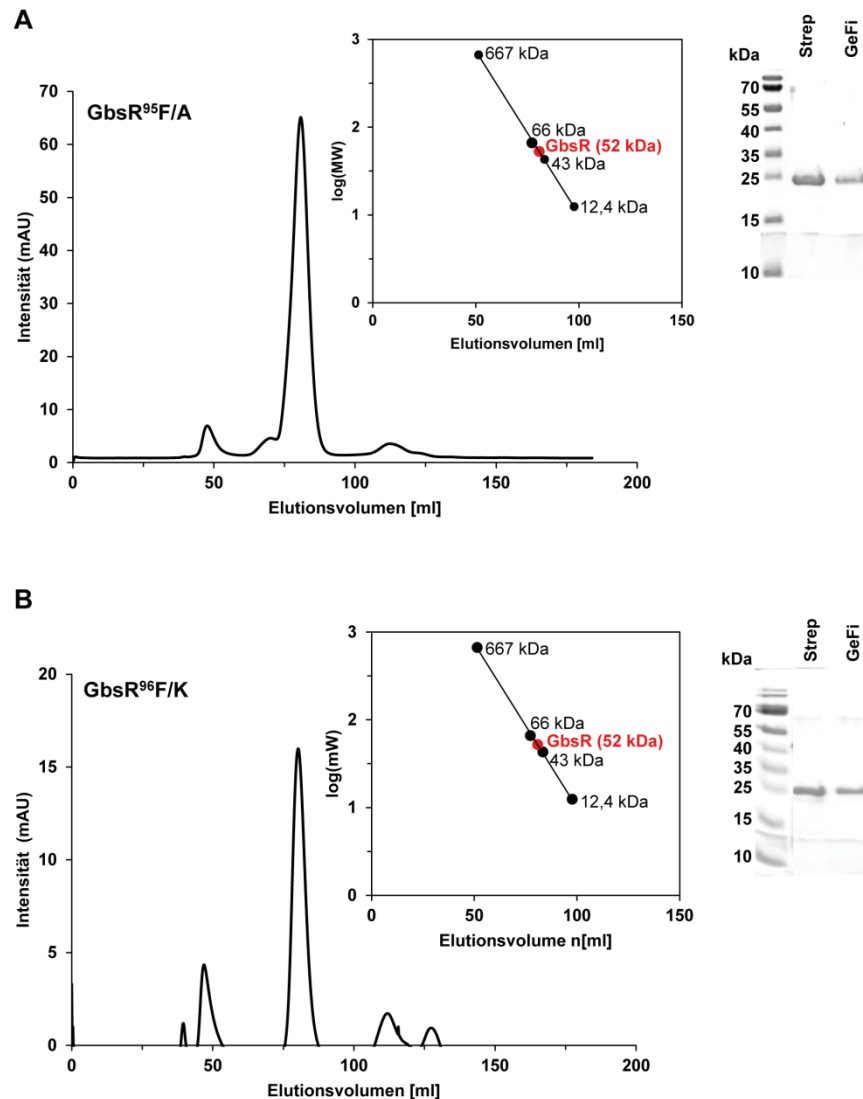


Abbildung 18 Größenausschlusschromatographie der GbsR Varianten GbsR⁹⁴F/A und GbsR⁹⁶F/K.

2 ml einer gereinigten Proteinlösung der GbsR Varianten **(A)** GbsR⁹⁴F/A (1,4 mg ml⁻¹) oder **(B)** GbsR⁹⁶F/K (1 mg ml⁻¹) wurden auf eine Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg) aufgetragen. Als Puffer diente 100 mM KPP (pH 8) mit 300 mM NaCl. Für die Kalibrierung der Säule wurden Thyroglobulin (667 kDa), Rinderserum Albumin (66 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Cytochrom C eines Pferdeherzens (12,4 kDa) als Referenzproteine verwendet. Die Reinheit, sowie die Molekularmasse der Proteine wurden im Anschluss an die Größenausschlusschromatographie mittels SDS-Gel (15%) analysiert.

Die dominanten Peaks bei einem Elutionsvolumen von 81 ml entsprechen einem Protein von etwa 52 kDa. Da die Fusionsproteine aus GbsR und einem C-terminalen Strep-Tag ein Molekulargewicht von 22 kDa aufweisen wird hierdurch ein GbsR Dimer angezeigt. Die zusätzlichen Peaks bei einem Elutionsvolumen von 47 ml deuten auf eine geringe Menge an aggregiertem Protein hin (Abbildung 18), was jedoch auch für den Wildtyp zu beobachten ist (Abbildung 9). Somit konnte bestätigt werden, dass die eingeführten Aminosäureaustausche in GbsR⁹⁵F/A und GbsR⁹⁶F/K keinen Einfluss auf die strukturelle Integrität des Repressors haben.

13 GbsR-Typ Proteine als Sub-Gruppe der MarR-Familie transkriptioneller Regulatoren

In Abschnitt 10 konnte gezeigt werden, dass GbsR, der Regulator der Glycinbetain Synthese, innerhalb der Gattung *Bacillus* weit verbreitet ist. Nau-Wagner *et al.* stellten darüber hinaus durch Datenbank Analysen der Verbreitung von GbsR-Typ Proteine fest, dass sich verwandte Proteine auch in der Gattung *Staphylococcus* finden lassen. Hierbei ließen sich die kodierenden Gene nicht nur angrenzend zu Genen finden, die in die Synthese von Glycinbetain involviert sind, sondern auch angrenzend an solche Gene, die für Aufnahmesysteme kompatibler Solute kodieren (Nau-Wagner *et al.*, 2012).

13.1 Phylogenetische Verbreitung von GbsR-Typ Regulatoren

Die phylogenetische Verbreitung von GbsR-Typ Regulatoren innerhalb der Domänen *Bacteria* und *Archaea* wurde mit Hilfe der IMG/M Datenbank (Chen *et al.*, 2017a) analysiert. Hierfür wurden nur diejenigen Genome verwendet, die vollständig sequenziert waren. Zudem wurde die Suche auf einen Vertreter pro Spezies beschränkt, für den zusätzlich 16S rDNA Informationen in der SILVA Datenbank (Glöckner *et al.*, 2017) zur Verfügung standen (150 *Archaea* und 1650 *Bacteria*). Durch eine BLAST Suche (Altschul *et al.*, 1990) mit der Aminosäuresequenz von GbsR aus *B. subtilis* (Nau-Wagner *et al.*, 2012) konnten insgesamt 179 GbsR-Homologe in 146 Organismen identifiziert werden (Abbildung 19). Hiervon wurden 29 GbsR-Typ Proteine in 29 *Archaea* und 150 GbsR-Typ Proteine in 117 *Bacteria* gefunden. Innerhalb der *Archaea* konnten GbsR-Homologe ausschließlich im Phylum der *Euryarchaeota* gefunden werden. Hierbei handelt es sich um eine physiologisch sehr diverse Gruppe, die extrem halophile, termophile und methanogene Vertreter beinhaltet (Woese *et al.*, 1990; Pesaro und Widmer, 2002). Zu dieser Gruppe zählt auch *M. jannaschii*, dessen GbsR-Homolog Mj223 (Ray *et al.*, 2003) als Basis für das GbsR *in silico* Modell verwendet wurde [Abbildung 4 (Nau-Wagner *et al.*, 2012)].



Abbildung 19 Phylogenetische Verteilung von GbsR-Typ Regulatoren in Archaea und Bacteria.

146 Mikroorganismen, deren Genom mindestens ein *gbsR*-Typ Gen aufweist wurden bioinformatisch identifiziert. Mit Hilfe der IMG/M Datenbank (Chen *et al.*, 2017a) wurden GbsR Homologe durch eine BLAST Suche (Altschul *et al.*, 1990) mit der Aminosäuresequenz von GbsR aus *B. subtilis* (Nau-Wagner *et al.*, 2012) identifiziert. Die Suche wurde dabei auf vollständig Sequenzierte Genome beschränkt. Zudem wurde nur ein Vertreter pro Spezies analysiert, für den zusätzlich 16S rDNA Informationen in der SILVA Datenbank vorlagen (Glöckner *et al.*,

2017). Der phylogenetische Stammbaum wurde auf Basis der 16S rDNA Informationen mit Hilfe des „Distance Tree“ Tools des JGI Webservers (Chen *et al.*, 2017a) erstellt. Die identifizierten GbsR Homologe wurden auf Basis ihrer unmittelbaren Gennachbarschaft gruppiert. Hierbei wurden *gbsR*-Typ Gene in der Nähe von Glycinbetain Synthese Genen als GbsR (rot) bezeichnet (Nau-Wagner *et al.*, 2012). *gbsR*-Typ Gene, deren angrenzende Gencluster Transporter für kompatible Solute kodieren wurden nach der Art des jeweiligen Transporters als OpuAR [blau (Ronzheimer *et al.*, 2018)], YvaV (grün) oder OpcR [orange (Lee *et al.*, 2013)] bezeichnet. Dabei stehen hellblaue Boxen für *opuAR*-Typ Gene, die assoziiert mit einem *opuA* Gencluster vorliegen, in dem die Permease und das Substratbindeprotein durch ein einzelnes Gen kodiert werden. Wurden Gene für einen anderen Typ von Transporter in der Gennachbarschaft der *gbsR*-Typ Gene gefunden, wurden diese als Andere (pink) zusammengefasst. Schwarze Boxen markieren *gbsR*-Typ Gene, die angrenzend an Gene für Cytochrom *bd* Oxidasen gefunden wurden. Diese wurden nach Xia *et al.* (2018) als CydE bezeichnet. Als Unbekannt (hell violett) wurden GbsR Homologe bezeichnet, deren genetische Umgebung keinen Rückschluss auf eine mögliche Funktion zuließen.

Innerhalb der *Bacteria* konnten GbsR-Typ Regulatoren hauptsächlich in Vertretern der Alpha- und Betaproteobacteria, der Firmicutes und der Bacteroidetes gefunden werden (Abbildung 19). Mit Hilfe des „neighborhood Tools“ des IMG/M Web-Servers (Chen *et al.*, 2017a) wurde die unmittelbare Gennachbarschaft der *gbsR*-Typ Gene untersucht. 73 GbsR Homologe lagen in einer genetischen Umgebung vor, die keinen Rückschluss auf eine mögliche Funktion zuließ. Zu dieser Gruppe zählt die Mehrheit (27/29) der GbsR Homologe, die in *Archaea* identifiziert wurden (Abbildung 19). Die übrigen 106 GbsR Homologe konnten anhand ihrer Gennachbarschaft in vier Kategorien eingeteilt werden (Abbildung 19). Hierbei wurden sieben *gbsR*-typ Gene angrenzend an Gene gefunden, die verschiedene Transporter für Ammonium, Molybdän oder Zucker kodieren. Innerhalb dieser Gruppe wurde zudem ein GbsR Homolog identifiziert, das mit einem BCCT-Transporter vermutlich für Glycinbetain (Ziegler *et al.*, 2010) assoziiert vorliegt. Darüber hinaus wurden 34 *gbsR*-Typ Gene in unmittelbarer Nachbarschaft zu *cydAB* oder *cydABCD* Genclustern gefunden. Diese kodieren für Sauerstoff Reduktasen des Cytochrom *bd*-Typs (Borisov *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2018). 27 *gbsR*-typ Gene grenzten an Glycinbetain Synthese Gene (Nau-Wagner *et al.*, 2012) und 38 *gbsR*-Typ Gene an solche für ABC-Transporter des OpuA-, OpuB- oder OpuC-Typs (Hoffmann und Bremer, 2016; Hoffmann und Bremer, 2017).

13.2 GbsR-Typ Regulatoren die mit Cytochrom *bd* Sauerstoff Reduktasen assoziiert sind

Sauerstoff Reduktasen des Cytochrom *bd*-Typs dienen als alternative terminale Oxidasen in der Atmungskette vieler Prokaryoten (Borisov *et al.*, 2011; Degli Esposti *et al.*, 2015). Sie liegen als integrale Membranproteine aus zwei Untereinheiten vor, die drei Häme (*b*₅₅₈, *b*₅₉₅, *d*) enthalten. Dabei wird angenommen, dass die Häme *b*₅₉₅ und *d* ein Di-Häm Zentrum für die Reduktion von Sauerstoff bilden (Borisov *et al.*, 2011). Cytochrom *bd*-Typ Oxidasen ermöglichen pathogenen und nicht-pathogenen Bakterien die Besiedlung von sauerstoff-armen Umgebungen (Shi *et al.*, 2005; Loisel-Meyer *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2007). Darüber hinaus schützen sie sauerstoff-sensitive Enzyme, unterstützen anaerobes

photosynthetisches Wachstum und spielen eine Rolle für die Virulenz der pathogenen *Salmonella*, *Bacteroides* und *Listeria* (Borisov *et al.*, 2011).

Die 34 *gbsR*-verwandten Gene die in ihrer unmittelbaren Gennachbarschaft ein *cydAB* oder ein *cydABCD* Gencluster aufweisen, sind alle in Vertretern der Alpha-, Beta- und Gammaproteobacteria zu finden (Abbildung 19). Neben den Genen *cydA* und *cydB*, die für die beiden Untereinheiten der Cytochrom *bd*-Typ Oxidasen kodieren, konnten in machen der hier identifizierten Genclustern zudem die Gene *cydC* und *cydD* gefunden werden (Abbildung 20). Sie kodieren für einen heterodimeren ABC-Transporter, der essentiell für die Assemblierung des Cytochrom *bd* Komplexes ist (Borisov *et al.*, 2011). Ein weiteres Gen, *cydX*, ist in einigen der Gencluster vorzufinden (Abbildung 20). Für das CydX Protein wird eine Funktion in der Assemblierung und Stabilisierung des di-Häm Zentrums innerhalb des CydAB Komplexes angenommen (Hoeser *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015).

In *Alishewanella* sp. WH16-1 ist eine *cydAB* kodierte Cytochrom *bd* Oxidase an der Resistenz gegen Sulfid und Chromat beteiligt (Xia *et al.*, 2018). Die Regulation dieses Gencluster auf transkriptioneller Ebene wurde kürzlich von Xia *et al.* (2018) beschrieben. Hierbei identifizierten die Autoren ein Gen mit regulatorischer Funktion, in der direkten Umgebung des *cydAB* Operons von *Alishewanella* sp. WH16-1 und engen Verwandten aus der Alteromonadaceae Familie, welches als *cydE* benannt wurde. CydE agiert als Repressor des *cydAB* Operons, dessen Wirkung in Gegenwart von Sulfat aufgehoben wird. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Untersuchung erfolgte eine Klassifikation von CydE als GbsR-Typ Regulator (Xia *et al.*, 2018).

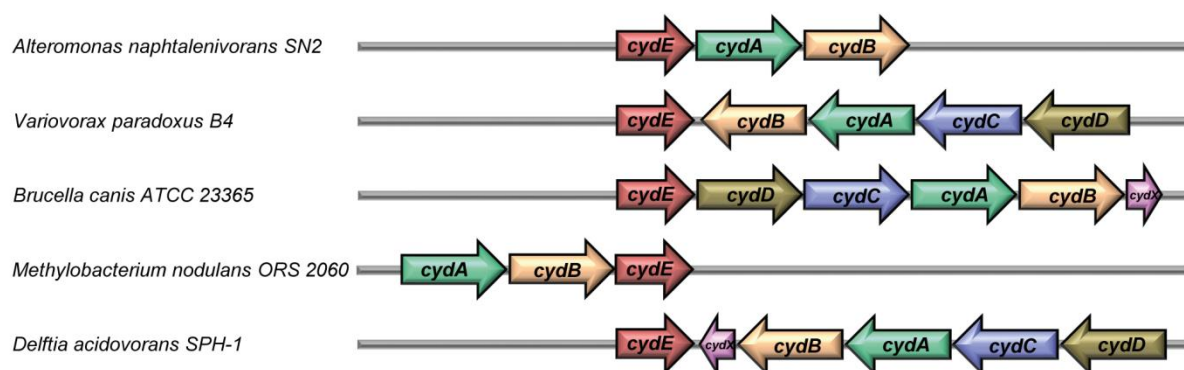


Abbildung 20 Genetische Organisation von *gbsR*-verwandten Genen die zusammen mit Genen für Cytochrom *bd*-Typ Sauerstoff Reduktasen vorliegen.

Es konnten 34 Gene für GbsR-Typ Regulatoren angrenzend an Gene für alternative terminale Oxidasen des Cytochrom *bd*-Typs (Borisov *et al.*, 2011; Degli Esposti *et al.*, 2015) gefunden werden. Unter Verwendung der Nomenklatur von Xia *et al.* wurden diese *cydE* (rot) genannt (Xia *et al.*, 2018). Die Gene *cydA* (grün) und *cydB* (hell orange) kodieren die beiden Untereinheiten der Cytochrom *bd* Sauerstoff Reduktase. In einigen Genclustern lagen zudem die Gene *cydC* (blau) und *cydD* (braun) vor, die für einen ABC-Transporter mit wichtiger Funktion in der Assemblierung des Cytochrom *bd* Komplexes kodieren (Borisov *et al.*, 2011; Degli Esposti *et al.*, 2015). Manche Gencluster enthielten darüber hinaus ein Gen für das Protein CydX (pink), für das eine Funktion in der Assemblierung und Stabilisierung des di-Häm Zentrums innerhalb des CydAB Komplexes angenommen wird (Hoeser *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015).

13.3 GbsR-Typ Regulatoren die mit der Synthese von Glycinbetain assoziiert sind

Die Synthese der Trimethylammonium Verbindung Glycinbetain erfolgt in vielen Mikroorganismen durch die Oxidation von Cholin. Für die enzymatische Katalysation dieses Prozess können verschiedene Enzyme genutzt werden (Lamark *et al.*, 1991; Boch *et al.*, 1996; Salvi *et al.*, 2014). In *B. subtilis* wird die initiale Oxidation von Cholin zu Glycinbetain Aldehyd durch die Typ-III Alkoholdehydrogenase GbsB katalysiert. Dieses Intermediat wird in einem zweiten Schritt durch die Glycinbetaine Aldehyd Dehydrogenase GbsA zu Glycinbetain umgewandelt (Boch *et al.*, 1996). In *E. coli* wird dieser Prozess durch die membranständige Cholin Dehydrogenase BetA katalysiert, die sowohl die Umsetzung von Cholin zu Glycinbetain Aldehyd, als auch die Oxidation des Intermediates zu Glycinbetain bewerkstelligen kann. Hierbei stellt eine zusätzliche Glycinbetaine Aldehyd Dehydrogenase (BetB) sicher, dass es nicht zu einer Akkumulation des toxischen Aldehyds kommt (Lamark *et al.*, 1991). In beiden Fällen ist der vorherige Import des Vorläufermoleküls Cholin nötig. Während diese Aufgabe in *B. subtilis* durch die ABC-Transporter OpuB und OpuC verrichtet wird (Kappes *et al.*, 1999), dient BetT, ein Transporter der BCCT-Familie in *E. coli* für die Aufnahme von Cholin (Lamark *et al.*, 1991).

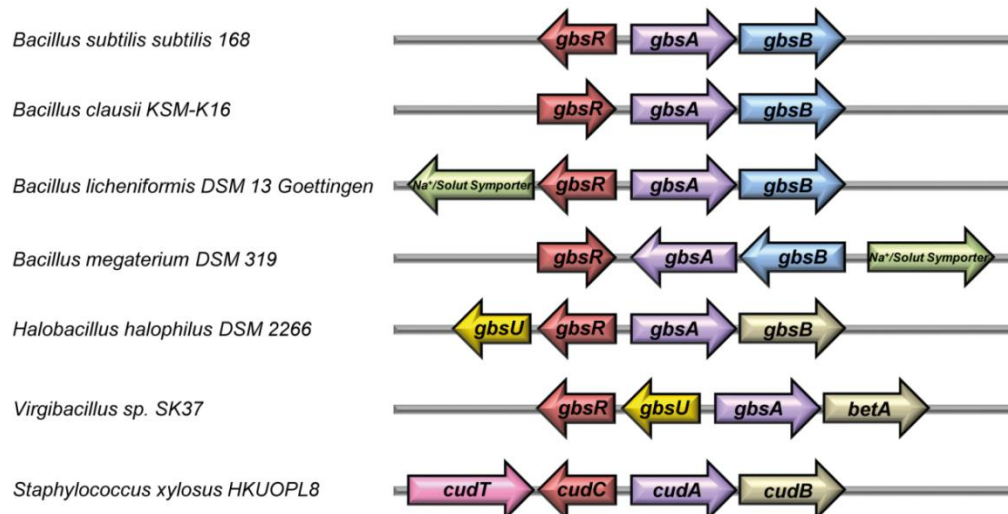


Abbildung 21 Genetische Organisation von *gbsR*-verwandten Genen die zusammen mit Genen für die Synthese von Glycinbetain vorliegen.

Es konnten 27 Gene für GbsR-Typ Regulatoren identifiziert werden, deren angrenzende Gene an der Synthese von Glycinbetain beteiligt sind. Alle Vertreter der Gattung *Bacillus* wiesen Gencluster mit einer Cholin Dehydrogenase des GbsB-Typs [blau (Boch *et al.*, 1996)] auf. Dagegen kommt in Glycinbetain Synthesewegen der Vertreter der Gattung *Staphylococcus* eine Cholin Dehydrogenase vor, die mit dem BetA Enzym aus *E. coli* verwandt ist [gold (Lamark *et al.*, 1991)]. Einige der analysierten Gencluster enthalten Gene für Transportsysteme. Diese sind farblich auf Basis ihrer Zugehörigkeit zu einer Superfamilie kodiert. *gbsU*-Typ Gene (gelb) kodieren für Proteine, die den Substratbindepoteinen von ABC-Transportern ähnlich sind (Scheepers *et al.*, 2016), *cudT*-Typ Gene (pink) kodieren Transporter der BCCT-Familie (Ziegler *et al.*, 2010) und Gene für Transporter der SSS-Familie (Bracher *et al.*, 2016) sind grün markiert. Im Fall von *H. halophilus* DSM 2266 (Burkhardt *et al.*, 2009) wurde das Gen für die Cholin Dehydrogenase nach der *B. subtilis* Nomenklatur als *gbsB* (Boch *et al.*, 1996) benannt. Bei dieser Cholin Dehydrogenase handelt es sich jedoch um ein BetA-Typ Enzym (Lamark *et al.*, 1991).

In der Dantenbank Analyse konnten 27 GbsR Homologe identifiziert werden, die in einem genetischen Kontext mit Systemen für die Synthese des kompatiblen Soluts Glycinbetain vorliegen (Abbildung 19). Bei einer Analyse der angrenzenden Glycinbetaine Synthese Gene konnte sowohl der *gbsAB*-Typ als auch der *betA*-Typ gefunden werden. Eine repräsentative Darstellung der genetischen Organisation der verschiedenen Gencluster ist in Abbildung 21 gezeigt. Alle Vertreter der Gattung *Bacillus* wiesen hierbei Kombinationen aus Genen für die Typ-III Alkoholdehydrogenase GbsB und der Glycinbetaine Aldehyd Dehydrogenase GbsA (Boch *et al.*, 1996) auf. Darüber hinaus enthielten die Gencluster von *Bacillus licheniformis* DSM 13 und *Bacillus megaterium* DSM 319 ein Gen für einen Transporter der SSS-Familie [Abbildung 21 (Bracher *et al.*, 2016)]. Dieser könnte z. B. dem Import von Cholin für die Glycinbetain Synthese dienen. In den 13 weiteren Synthese Genclustern konnte die genetische Konfiguration aus *E. coli* (Lamark *et al.*, 1991) gefunden werden. Die genetische Organisation dieser Gruppe ist exemplarisch anhand von *H. halophilus* DSM 2266, *Virgibacillus* sp. SK37 und *S. xylosus* HKUOPL8 dargestellt (Abbildung 21). Innerhalb der Gencluster von *H. halophilus* und *Virgibacillus* sp. SK37 konnte zudem ein Gen (*gbsU*) für ein ABC-Transporter typisches Substratbindeprotein (Davidson *et al.*, 2008) gefunden werden. Jedoch ließen sich weder Gene für eine Transmembrankomponente oder eine ATPase finden (Abbildung 21). *In silico* Modelle der GbsU Substratbindeproteine (Abbildung 22AB) zeigten eine putative Ligandenbindebox aus aromatischen Aminosäuren, mit einer ähnlichen Architektur wie die des OpuAC Substratbindeproteins aus *B. subtilis* [Abbildung 22D (Horn *et al.*, 2006)]. Hierbei handelt es sich um ein typisches Merkmal von Substratbindeproteinen, die an dem Transport von kompatiblen Soluten beteiligt sind. Solche „aromatic cages“ koordinieren die methylierten Kopfgruppen von kompatiblen Soluten, wobei die positiv geladenen Kopfgruppen mit dem elektronegativen Oberflächenpotential der Aromaten via Kationen- π Interaktion interagieren (Schiefner *et al.*, 2004a; Schiefner *et al.*, 2004b; Horn *et al.*, 2006; Smits *et al.*, 2008; Oswald *et al.*, 2008; Wolters *et al.*, 2010; Du *et al.*, 2011; Pittelkow *et al.*, 2011; Lang *et al.*, 2015).

Für das Glycinbetain Synthese Gencluster von *H. halophilus* konnte zuvor schon gezeigt werden, dass die Gene *gbsA* und *gbsB* ein Operon bilden. Die Gene des Regulators GbsR und des Substratbindeproteins GbsU liegen in einem zweiten entgegengesetzt orientierten Operon vor [Abbildung 21 (Burkhardt *et al.*, 2009)]. Ihre Transkription wird in Gegenwart von Cholin induziert (Burkhardt *et al.*, 2009). Obwohl Burkhardt *et al.* (2009) die Benennung der Cholin Dehydrogenase nach der *B. subtilis* Nomenklatur als GbsB (Boch *et al.*, 1996) vorgenommen haben, handelt es sich hierbei um ein BetA-Typ Enzym (Lamark *et al.*, 1991). Ein Gencluster mit ähnlichem Aufbau wurde auch in *H. dabanensis* analysiert. Hierbei wurde jedoch eine abweichende Nomenklatur für die Gene *gbsR* und *gbsU* (*gbsI* und *gbsT*) verwendet (Gu *et al.*, 2008).

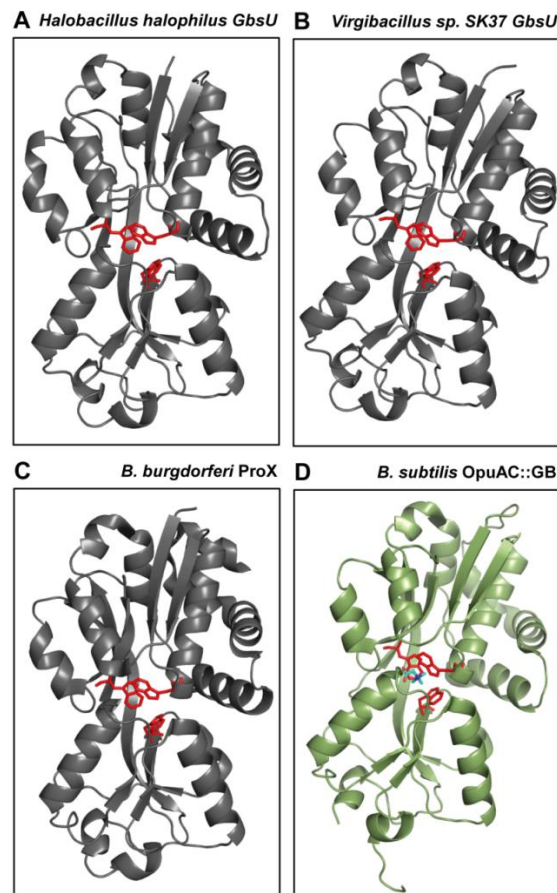


Abbildung 22 In silico Modelle der GbsU Substratbindeproteine.

Dargestellt sind die Substratbindeproteine der Glycinbetain Synthese Geneclustern aus (A) *H. halophilus* DSM 2266 und (B) *Virgibacillus* sp. SK37 auf Basis der Kristallstruktur des Proteins (C) ProX aus *Borrelia burgdorferi* [PDB 3TMG (SSGCID, Gardberg, A., Fox, D., Staker, B., Stewart, L.; unpublizierte Daten)]. Alle diese Substratbindeproteine weisen eine Ligandenbindetasche mit einer ähnlichen Architektur wie (D) OpuAC aus *B. subtilis* auf. Glycinbetain, ein Ligand von OpuAC ist in blau hervorgehoben. Aromatische Aminosäuren, die an der Ligandenbindung in GbsU beteiligt sein könnten, sind in rot markiert.

Physiologische und genetische Untersuchungen wurden auch mit dem Glycinbetain Synthese Genecluster aus *S. xylosus* durchgeführt (Rosenstein *et al.*, 1999). Das *gbsR*-typ Gen wurde hierbei *cudC* (Rosenstein *et al.*, 1999) genannt, das hierdurch kodierte Protein weist eine Sequenzidentität von 52% mit GbsR aus *B. subtilis* (Boch *et al.*, 1996) auf. Angrenzend an *cudC* ist in umgekehrter Orientierung ein Gen (*cudT*), das für einen Transporter der BCCT-Familie (Abbildung 21) kodiert lokalisiert. Dieser dient als Cholin Importer (Rosenstein *et al.*, 1999). In diesem System wurde die Cholin Dehydrogenase CudB und die Glycinbetaine Aldehyd Dehydrogenase CudA genannt. Die Expression ihrer Gene wird nicht nur durch die Anwesenheit von Cholin, sondern auch durch erhöhte Salinitäten induziert (Rosenstein *et al.*, 1999). Ein Genecluster dieses Aufbaus konnte in allen Vertretern der Gattung *Staphylococcus* gefunden werden, so auch in dem pathogenen Vertreter *Staphylococcus aureus* (Abbildung 19).

13.4 GbsR-Typ Regulatoren die mit Aufnahmesystemen für kompatible Solute assoziiert sind

Das Genom von *B. subtilis* (Smith *et al.*, 2014) weist drei Gene für GbsR-Typ Regulatoren auf. Sie grenzen an die Glycinbetain Synthese Gene (*gbsAB*), sowie die Gene für die Cholin Importer OpuB und OpuC an (Kappes *et al.*, 1999; Nau-Wagner *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013).

Es konnten 38 GbsR-Typ Proteine in der direkten Gennachbarschaft von ABC-Transportern des OpuA-, OpuB- und OpuC-Typs (Hoffmann und Bremer, 2016; Hoffmann und Bremer, 2017) identifiziert werden. Sie waren ausschließlich in Vertretern des Phylums Firmicutes zu finden (Abbildung 19). Die Verbreitung der *gbsR*-Typ Gene, die mit Genen für OpuB- oder OpuC-Transporter (Kappes *et al.*, 1999) vorliegen, beschränkte sich auf Mitglieder der Gattung *Bacillus* (Abbildung 19). Ihre genetische Organisation gleicht derer aus *B. subtilis* [Abbildung 23B (Kappes *et al.*, 1999)].

Übereinstimmend mit Analysen von S. Ronzheimer (2015) konnten GbsR-Typ Proteine zudem assoziiert mit ABC-Transportern des OpuA-Typs gefunden werden. Diese wurden als OpuAR bezeichnet (Ronzheimer, 2015; Ronzheimer *et al.*, 2018) und lassen sich überwiegen innerhalb der *Paenibacilli* finden (Abbildung 18). Ihre representative genetische Organisation ist in Abbildung 23A anhand der *opuA* Gencluster aus *B. infantis* und *Paenibacillus larvae* dargestellt.

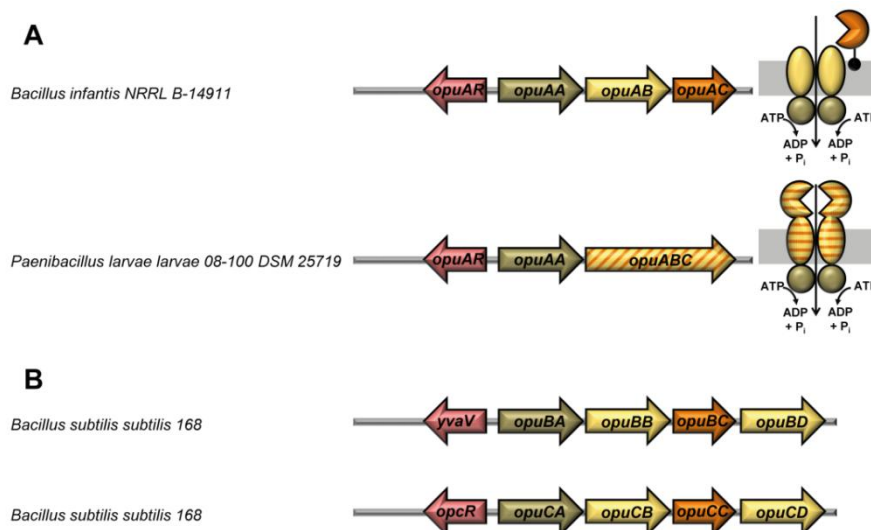


Abbildung 23 Genetische Organisation von *gbsR*-Typ Genen, die mit Transportern des OpuA-, OpuB- und OpuC-Typs assoziiert sind.

(A) Genetische Organisation der *opuA* Gencluster, sowie Aufbau der kodierten Transporter. Die Gene von 18 GbsR Homologen (OpuAR) wurden in der unmittelbaren Umgebung von Genen für OpuA-Typ Transporter (Kempf und Bremer, 1995; Obis *et al.*, 1999; Wolters *et al.*, 2010) gefunden. In drei *Paenibacilli* (hier repräsentiert durch *P. larvae*) werden die Permease (*opuAB*) und das Substratbindeprotein (*opuAC*) des OpuA Transporters durch ein einziges Gen kodiert (van der Heide und Poolman, 2002). (B) 7 *gbsR*-Typ Gene (*yvaV*) wurden angrenzend an *opuB*-Typ Gencluster gefunden (Nau-Wagner *et al.*, 2012). 13 *gbsR*-Typ Gene [*opcR* (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013)] lagen mit Genen für OpuC-Typ Transportern assoziiert vor (Kappes *et al.*, 1999).

Der OpuA Transporter aus *B. subtilis* besteht aus einer ATPase (OpuAA), einer Permease (OpuBA) und einem Substratbindepotein (OpuAC), das mittels einer Lipidmodifikation in der Zytoplasmamembran verankert wird (Kempf und Bremer, 1995; Kempf *et al.*, 1997; Horn *et al.*, 2006; Smits *et al.*, 2008). In drei Fällen (*P. larvae*, *Paenibacillus terrae* und *Paenibacillus polymyxa*) konnte hiervon abweichend ein *opuA* Gencluster identifiziert werden, in dem die Permease (*opuAB*) und das Substratbindepotein (*opuAC*) des OpuA Transporters durch ein einziges Gen kodiert werden (Abbildung 23A). Diese Art des Aufbaus, bei dem das Substratbindepotein an die Transmembrandomäne fusioniert ist, konnte z.B. für den OpuA Transporter aus *Lactococcus lactis* (Obis *et al.*, 1999; Mahmood *et al.*, 2006; Wolters *et al.*, 2010) schon gezeigt werden. Ein fusionierter Transporter (OpuF), mit Ähnlichkeit zu OpuC aus *B. subtilis* ist zudem innerhalb der Gattung *Bacillus* weit verbreitet (Teichmann *et al.*, 2018).

13.5 Analyse der Verwandtschaft von GbsR-Typ Proteinen

Um die Verwandtschaft der GbsR-Typ Proteine zu untersuchen wurde ein Kladogramm mit Hilfe des iTOL Webserver (Letunic und Bork, 2016) angefertigt. Die resultierenden Daten sind in Abbildung 24 dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass die Gruppierung der *gbsR*-Typ Gene auf Basis ihrer Gennachbarschaft (Abbildung 19) durch die Position ihrer kodierten Proteine innerhalb des Kladogramms (Abbildung 24) wiedergespiegelt wird.

Ein Aminosäuresequenzvergleich der 65 GbsR-Typ Proteine, die entweder mit der Glycinbetain Synthese oder einem OpuA-, OpuB- oder OpuC-Typ Transporter für kompatible Solute assoziiert sind zeigte, dass die aromatischen Aminosäuren der putativen GbsR Ligandenbindetasche (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Ronzheimer, 2015) stark konserviert sind (Abbildung 51). Zudem weisen alle Proteine dieser Gruppe strikt konservierte Aminosäuren im zentralen Bereich des flexiblen Linkers auf (Abbildung 51). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der GbsR-Typ Proteine, die mit der Synthese von Glycinbetaine assoziiert sind zeigte Sequenzidentitäten zwischen 97% (*Bacillus sp. JS*) und 41% (*Bacillus clausii* KSM-K16) zu GbsR aus *B. subtilis* [Abbildung 51 (Nau-Wagner *et al.*, 2012)]. Die Sequenzidentitäten der Transporter-assoziierten GbsR Homologe im Vergleich zu GbsR aus *B. subtilis* (Nau-Wagner *et al.*, 2012) reichten von 41% (*Desulfotomaculum reducens* MI-1) bis 28% (*Alkaliphilus oremlundii* OhILAs) für OpuAR-Typ Proteine, 35% (*Bacillus atrophaeus* 1942) bis 34% (*Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7) für OpuB-assoziierte Proteine und 34% (*B. atrophaeus* 1942) bis 29% (*Bacillus lehensis* G1) für OpcR-Typ Proteine (Abbildung 51).

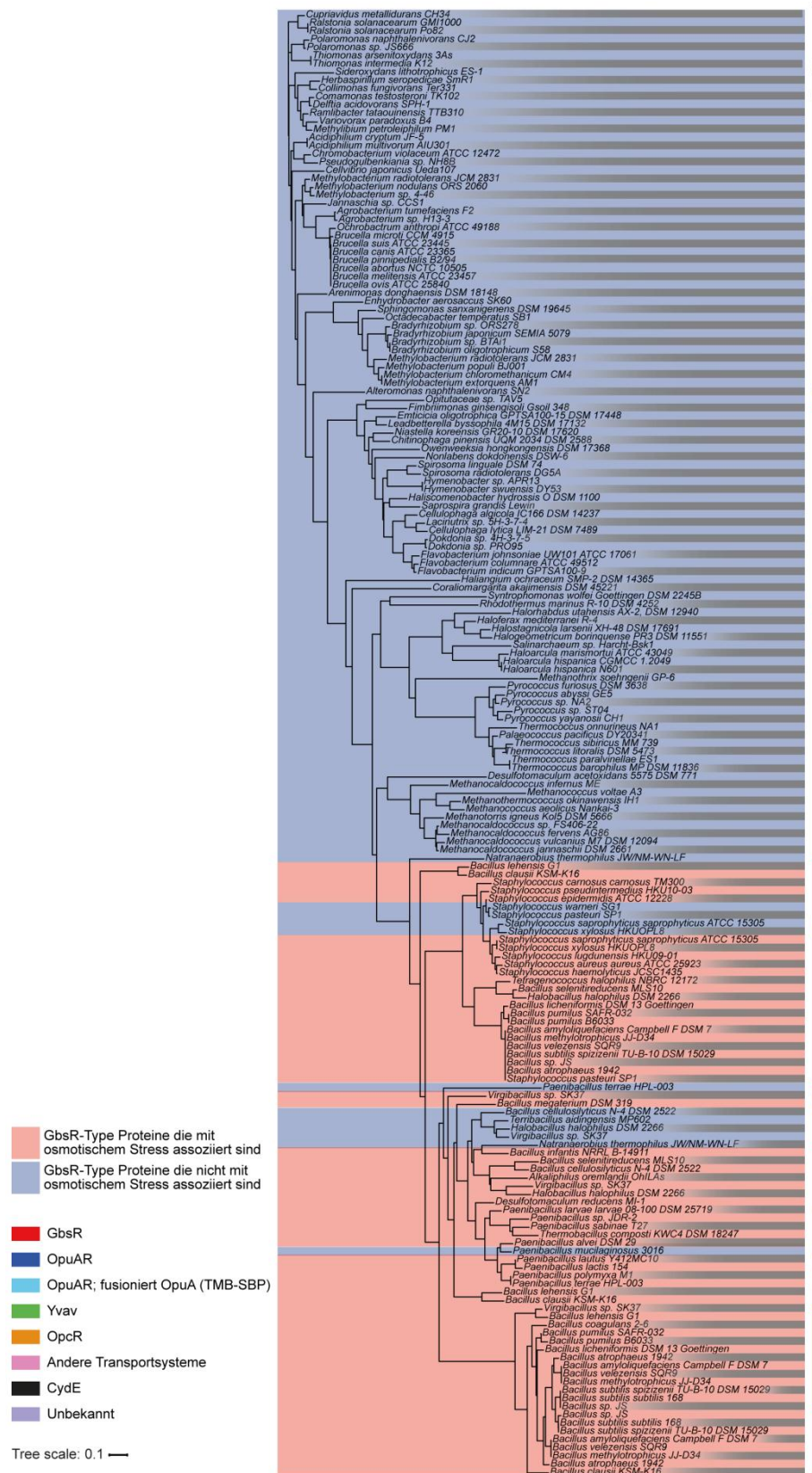


Abbildung 24 Kladogramm der GbsR-Typ Proteine der *Bacteria* und *Archaea*.

Mit Hilfe der IMG/M Datenbank (Chen *et al.*, 2017a) wurden 179 GbsR-Typ Proteine identifiziert. Die Klassifizierung der GbsR Homologe auf Basis ihrer Gennachbarschaft ist durch farbige Boxen gekennzeichnet. Diejenigen *gbsR*-Typ Gene, die angrenzend an Glycinbetain Synthese Gene oder an solche für Aufnahmesysteme für kompatible Solute identifiziert wurden, wurden in der Gruppe der mit osmotischem Stress assoziierten GbsR-Typ Proteine zusammengefasst (rot hinterlegt). Alle anderen GbsR Homologe wurden in der Gruppe der nicht mit osmotischem Stress assoziierten Gruppe (blau hinterlegt) zusammengeschlossen.

Durch die bioinformatische Analyse konnten 114 GbsR Homologe identifiziert werden, die nicht mit Mechanismen der Osmoprotektion assoziiert sind. Ein Vergleich ihrer Aminosäuresequenzen mit GbsR aus *B. subtilis* (Nau-Wagner *et al.*, 2012) wies einen deutlich geringeren Grad an konservierten Aminosäuren auf (Abbildung 52), als dies in der Gruppe von GbsR Homologen der Fall ist, die mit osmotischem Stress assoziiert sind. Die aromatischen Aminosäurereste, die in GbsR die putative Ligandenbindetasche formen (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Ronzheimer, 2015) waren bei Vertretern dieser Gruppe nicht vorzufinden. Die Sequenzidentitäten der 34 CydE-Typ Proteine mit der Sequenz von GbsR aus *B. subtilis* reichten von 21% (*Alteromonas naphthalenivorans* SN2) und 19% [*Methylobacterium* sp. 4-46 (Abbildung 52)]. Für die sehr diverse Gruppe der GbsR-Typ Proteine, die entweder mit Transportern unterschiedlicher Spezifität assoziiert sind oder deren Gene eine Umgebung aufweisen, die keine Vorhersage einer Funktion möglich machen, reichten die Sequenzidentitäten zu GbsR aus *B. subtilis* (Nau-Wagner *et al.*, 2012) von 51% (Transporter aus *Staphylococcus saprophyticus saprophyticus* ATCC 15305) bis 21% für ein Protein unbekannter Funktion aus *Rhodothermus marinus* R-10 DSM 4252 (Abbildung 52).

14 Regulation des *opuA* Genclusters aus *B. infantis* NRRL B-14911

Bioinformatische Analysen des marine Bakteriums *B. infantis* (Siefert *et al.*, 2000; Massilamany *et al.*, 2016) zeigten, dass das Genom neben Genen für einen OpuA-Typ Transporter auch Gene für Transporter des OpuF-, OpuD- und OpuE-Typs aufweist [Abbildung 7 (Teichmann *et al.*, 2018)]. Vorangegangene Analysen des OpuA Transporters durch C. Arnhold (2011) und S. Ronzheimer (2015) zeigten, dass es sich hierbei um einen Transporter mit ähnlichem Substratspektrum wie der OpuA Transporter aus *B. subtilis* (Hoffmann und Bremer, 2016; Hoffmann und Bremer, 2017) handelt. Neben Glycinbetain, Prolinbetain, Homobetain und DMSP wird auch DMG über den OpuA Transporter aufgenommen, letzteres jedoch mit schlechterer Effizienz (Arnhold, 2011; Ronzheimer, 2015; Ronzheimer *et al.*, 2018).

14.1 Expression der *opuA* Gene in Abhängigkeit von hohen Salinitäten

Typischerweise wird die Expression von Genen für Transportsystemen, die der Aufnahme von kompatiblen zur Osmoprotektion dienen, durch steigende Salinitäten induziert (Lucht und Bremer, 1994; Wood, 1999; Wood *et al.*, 2001; Krämer, 2010; Wood, 2011; Hoffmann und Bremer, 2016; Hoffmann und Bremer, 2017).

Um zu prüfen, ob dies auch der Fall für das *opuA* Gencluster aus *B. infantis* ist, wurde der Stamm STHB10 (OpuAR⁺) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen *B. subtilis* Stamm,

der in dem nicht-essentiellen *amyE* Locus eine stabil integrierte Kopie einer *opuAA_{B.i.}-treA* Reportergenfusion trägt. Neben der intergenen Region der *B. infantis* Gene *opuAR* und *opuAA*, trägt die Fusion zudem das kodierende Gen für den OpuAR Regulator. Zudem fehlen diesem Stamm die nativen *B. subtilis* *gbsR*-Typ Gene (*gbsR*, *yvaV* und *opcR*). STHB10 wurde in SMM mit unterschiedlichen Salinitäten bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} 1-1,5) kultiviert. Aliquots der Kulturen wurden durch Zentrifugation geerntet und es erfolgte die Bestimmung der TreA-Aktivität.

Hierbei zeigte sich lediglich eine geringe Steigerung der *opuAA-treA* Expressionslevel (Abbildung 25). In der Gegenwart von erhöhten NaCl Konzentrationen konnte eine 1,7-fache Steigerung der TreA-Aktivität von 73 ± 4 U mg Protein⁻¹ (SMM) auf 126 ± 3 U mg Protein⁻¹ (SMM 0,2 M NaCl) festgestellt werden. Bei steigenden Salinitäten, kam es jedoch zu keiner weiteren Erhöhung der Expressionslevel (Abbildung 25). Dieses Expressionsmuster könnte mit dem marinen Habitat von *B. infantis* (Siefert *et al.*, 2000) in Verbindung stehen, in dem das Bakterium permanent hohen Salinitäten von etwa 0,6 M NaCl ausgesetzt ist.

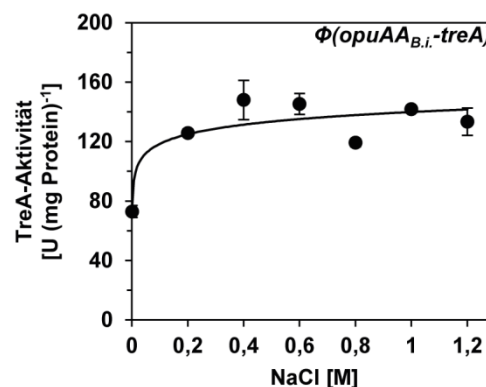


Abbildung 25 Salzinduktion der *opuA* Expression.

Expression der *opuAA-treA* Reportergenfusion in Abhängigkeit von der extrazellulären Salinität. Der Stamm STHB10 (*opuAA-treA*; *OpuAR*⁺) wurde in SMM mit unterschiedlichen NaCl Konzentrationen kultiviert. Kulturen mit einer OD_{578} von 1-1,5 wurden durch Zentrifugation geerntet und für die Bestimmung der TreA-Aktivität verwendet.

14.2 Expression der *opuA* Gene in Abhängigkeit von kompatiblen Soluten

Bei *OpuAR* handelt es sich um einen Repressor der *opuA* Expression. Die kompatiblen Solute Glycinbetain, Prolinbetain und Cholin agieren hierbei als Induktoren (Ronzheimer *et al.*, 2018). Um diesen Befund zu bestätigen, wurden die Stämme STHB10 (*OpuAR*⁺) und STHB11 (*OpuAR*⁻) in SMM mit 1,2 M NaCl in der An- und Abwesenheit verschiedener kompatibler Solute (je 1 mM) wie oben beschrieben kultiviert. Dabei konnten die Funktion von *OpuAR* als Glycinbetain-, Prolinbetain- und Cholin-abhängiger Repressor der *opuA* Expression bestätigt werden (Abbildung 26A). Somit dienen die *OpuA*-Substrate Glycinbetain und Prolinbetain als Induktoren. Homobetain und DMSP, die ebenfalls über den

OpuA Transporter aufgenommen werden, erfüllen diese Funktion jedoch nicht (Ronzheimer *et al.*, 2018). Im Gegensatz hierzu lässt sich die *opuA* Expression durch Cholin induzieren, welches weder ein Substrat des OpuA Transporters darstellt, noch eine osmoprotektive Wirkung in *B. infantis* hat (Ronzheimer *et al.*, 2018). Dies könnte vielleicht durch die strukturelle Ähnlichkeit von Glycinbetain- und Cholin-Bindetaschen erklärt werden (Schiefner *et al.*, 2004a; Schiefner *et al.*, 2004b; Horn *et al.*, 2006; Oswald *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2011). Da kompatible Solute in der Natur typischerweise nur in geringen Konzentrationen vorkommen (Bouskill *et al.*, 2016), wurde die Sensitivität der *opuA* Transkription in Gegenwart steigender Glycinbetain Konzentrationen evaluiert. Hierfür wurde der *opuAA-treA* Reporterstamm STHB10 in SMM mit 1,2 M NaCl und Glycinbetain Konzentrationen zwischen 0 und 300 μM kultiviert. Hierbei zeigte sich bereits bei Zugabe von 5 μM Glycinbetain eine deutliche Steigerung der Expressionslevel. Die Zugabe von 75 μM Glycinbetain war ausreichend für eine vollständige Induktion der *opuA* Expression (Abbildung 26B).

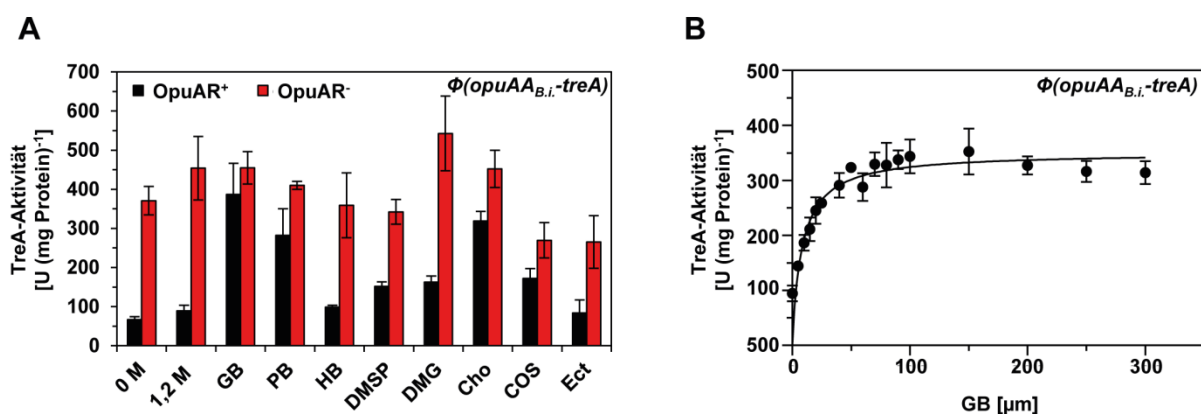


Abbildung 26 Substratinduktion der *opuA* Expression.

(A) Expression der *opuAA-treA* Reporterfusion in Abhängigkeit von extrazellulär vorliegenden kompatiblen Soluten. Die Stämme STHB10 (OpuAR⁺) und STHB11 (OpuAR⁻) wurden in SMM mit 1,2 M NaCl und in An- und Abwesenheit von 1 mM der angegebenen kompatiblen Solute kultiviert. Bei Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD₅₇₈ 1-1,5) wurden die Kulturen geerntet und zur Bestimmung der TreA-Aktivität eingesetzt. **(B)** Expression der *opuAA-treA* Reporterfusion in Abhängigkeit von der extrazellulären Glycinbetain Konzentration. Der Stamm STHB10 (*opuAA-treA*; OpuAR⁺) wurde in SMM mit 1,2 M NaCl und Glycinbetain Konzentrationen zwischen 0 und 300 μM bis zu einer OD₅₇₈ von 1-1,5 kultiviert. Aliquots dieser Kulturen wurden für TreA-Aktivitätsassays verwendet.

14.3 Das OpuAR Protein aus *B. infantis*

GbsR bindet den Induktor Cholin direkt mit einer K_D von $165 \pm 15 \mu\text{M}$ (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Eine vergleichbare K_D ($193 \pm 40 \mu\text{M}$) konnte auch für die Bindung von Cholin durch OpuAR bestimmt werden (Ronzheimer *et al.*, 2018). Im Gegensatz zu GbsR bindet dieser Regulator aber auch Glycinbetain mit einer K_D von $301 \pm 24 \mu\text{M}$ (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Ronzheimer *et al.*, 2018).

Ein *in silico* Model des OpuAR Proteins auf Basis des *M. jannaschii* Proteins Mj223 (Ray *et al.*, 2003) weist eine putative Ligandenbindetasche auf (Abbildung 27C), die eine große Ähnlichkeit zu der des GbsR *in silico* Models [Abbildung 27D (Nau-Wagner *et al.*, 2012)] hat. Eine genauere Betrachtung zeigt jedoch, dass die putative Ligandenbindetasche von OpuAR nur vier aromatische Aminosäuren aufweist, während diese bei GbsR aus sechs Aromaten gebildet wird (Abbildung 27CD). Wie auch im Fall des GbsR *in silico* Models ist die Vorhersage der räumlichen Orientierung der aromatischen Seitenketten innerhalb der putativen Ligandenbindebox nicht zuverlässig möglich, da Mj223 aus *M. jannaschii* [Abbildung 52 (Ray *et al.*, 2003)] eine solche Region nicht aufweist.

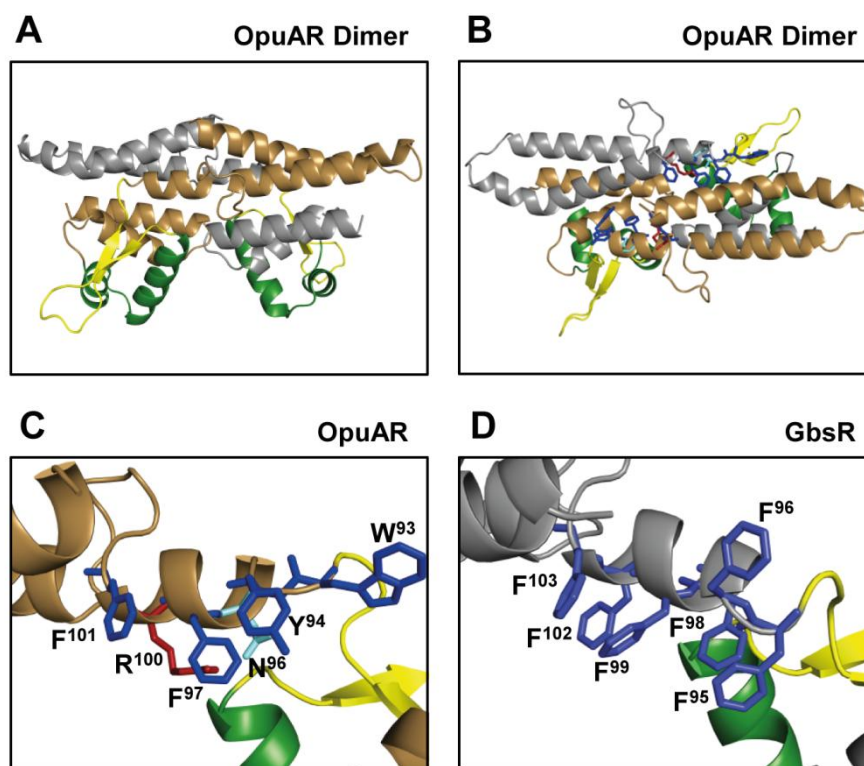


Abbildung 27 *In silico* Model des OpuAR Proteins aus *B. infantis*.

In silico Model des OpuAR Dimers in (A) seitlicher Ansicht und (B) von oben, sowie des (C) OpuAR Monomers auf Basis des DNA-bindenden Proteins Mj223 aus *M. jannaschii* [PDB 1KU9 (Ray *et al.*, 2003)]. (D) Dargestellt ist zudem ein *in silico* Modell des GbsR Proteins aus *B. subtilis* (Nau-Wagner *et al.*, 2012); ebenfalls auf Basis des Proteins Mj223 Proteins aus *M. jannaschii* [PDB 1KU9 (Ray *et al.*, 2003)]. Das Helix-Turn-Helix Motiv des DNA-Lesekopfs (grün), der flexible Linker (gelb) und die putative Ligandenbindetasche (blau) sind hervorgehoben. Im Fall von OpuAR wurden die zwei Aminosäurereste (N⁹⁶ und R¹⁰⁰) des „aromatic cages“, die von dem Aufbau in GbsR (Nau-Wagner *et al.*, 2012) abweichen in hellblau und rot markiert.

Dass es sich hierbei tatsächlich um die Ligandenbindetasche handelt, wird durch Mutagenesestudien in Verbindung mit Ligandenbindestudien untermauert (Ronzheimer *et al.*, 2018). Hierbei wurde eine Veränderung der Aminosäuresequenz des OpuAR Proteins in Richtung der Sequenz von GbsR aus *B. subtilis* (Nau-Wagner *et al.*, 2012) vorgenommen,

bei der das Tyrosin an Position 94 und das Arginin an Position 100 gegen Phenylalaninreste ausgetauscht wurden. Dieser Austausch führte zu einer 3-fach verbesserten Affinität des OpuAR Proteins zu Cholin und einer 4-fach verbesserten Affinität zu Glycinbetain (Ronzheimer *et al.*, 2018).

Das Protein *M. jannaschii* Protein Mj223 (Ray *et al.*, 2003) von dem sowohl die *in silico* Modelle von GbsR aus *B. subtilis* [Abbildung 4 (Nau-Wagner *et al.*, 2012)] und OpuAR aus *B. infantis* (Abbildung 26) abgeleitet wurden, wurde als Homodimer kristallisiert [PDB 1KU9 (Ray *et al.*, 2003)]. Für das *B. subtilis* Protein GbsR konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bereits gezeigt werden, dass es einen homodimeren Aufbau aufweist (Abbildung 9). Um zu prüfen, ob auch OpuAR die typische oligomere Struktur der MarR-Typ Regulatoren (Deochand und Grove, 2017) zeigt, wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Das resultierende Chromatogramm weist zwei Peaks auf (Abbildung 28). Während der dominante Peak bei einem Elutionsvolumen von 82 ml einem OpuAR Dimer entspricht (etwa 49 kDa), weist der kleinere Peak bei einem Elutionsvolumen von 48 ml (entspricht etwa 880 kDa) darauf hin, dass ein sehr kleiner Teil des heterolog produzierten Proteins in aggregierter Form vorliegt (Abbildung 28).

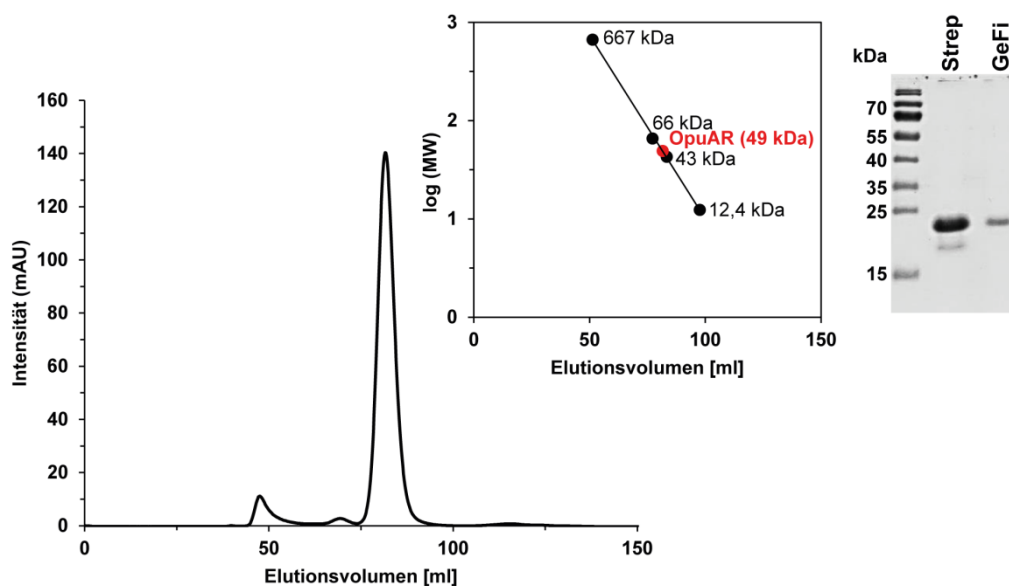


Abbildung 28 Größenausschlusschromatographie des OpuAR Proteins aus *B. infantis* und seine Analyse mittels SDS-Gel.

Unmittelbar nach der Reinigung des OpuAR Proteins wurden 2 ml der Proteinlösung ($1,5 \text{ mg ml}^{-1}$) auf eine Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg) aufgetragen. Der verwendete Puffer enthielt 100 mM KPP (pH 8) und 300 mM NaCl. Für die Kalibrierung der Säule wurden Thyroglobulin (667 kDa), Rinderserum Albumin (66 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Cytochrom C eines Pferdeherzens (12,4 kDa) als Referenzproteine verwendet. Die Reinheit, sowie die Molekularmasse von OpuAR wurden im Anschluss an die Größenausschlusschromatographie mittels SDS-Gel (15%) analysiert.

15 Regulation der verwandten Gencluster *opuB* und *opuC* in *B. subtilis*

Die beiden ABC-Transporter OpuB und OpuC aus *B. subtilis* sind nahe verwandt unterscheiden sich jedoch maßgeblich in ihrem Substratspektrum (Kappes *et al.*, 1999; Teichmann *et al.*, 2017; Teichmann *et al.*, 2018). Ob dies auch auf ihre transkriptionelle Regulation zutrifft, soll im folgenden Abschnitt analysiert werden.

15.1 Expression des *opuB* und *opuC* Operons in Abhängigkeit von der extrazellulären Osmolarität

In Übereinstimmung mit ihrer Funktion als Importer von kompatiblen Soluten zum Zweck der Osmoprotektion wird die Transkription des *opuB* und des *opuC* Operons osmotisch induziert (Kappes *et al.*, 1999; Steil *et al.*, 2003; Hahne *et al.*, 2010; Nicolas *et al.*, 2012). Western Blot Analysen von *B. subtilis* Zellen, die in Gegenwart von 0,4 M NaCl kultiviert wurden zeigten erhöhte Mengen der Substratbindepoteine OpuBC und OpuCC im Vergleich zu Zellen, die in Abwesenheit von NaCl wuchsen (Kappes *et al.*, 1999). Tilling Array Analysen von Nicolas *et al.* (2012) legen jedoch nahe, dass sich die beiden Transportsysteme nicht nur hinsichtlich ihrer Substratspektren (Hoffmann und Bremer, 2016; Hoffmann und Bremer, 2017) unterscheiden, sondern auch bezüglich ihrer transkriptionellen Antwort auf extrazelluläre Salinitäten. Während erhöhte Transkriptionslevel für das *opuB* Operon in Gegenwart von kontinuierlichem Salzstress (SMM mit 1,2 M NaCl) verzeichnet werden konnten, war dies für das *opuC* Operon nicht der Fall (Nicolas *et al.*, 2012). Die höchsten Transkriptionslevel des *opuC* Operons konnten nach einem Shock mit 0,4 M NaCl verzeichnet werden. Für *opuB* konnte hierbei keine signifikante Veränderung der Expression gezeigt werden (Nicolas *et al.*, 2012).

Um die transkriptionelle Antwort der beiden Gencluster auf kontinuierlichen Salzstress systematisch zu untersuchen wurden *opuBA-treA* und *opuCA-treA* Reportergenfusionen verwendet, die durch doppelt homologe Rekombination in dem *amyE* Locus des *B. subtilis* Stamm GNB37 ($\Delta treA$) integriert wurden. Die resultierenden Stämme STHB49 (*opuBA-treA*) und STHB33 (*opuCA-treA*) wurden in SMM mit NaCl Konzentrationen zwischen 0 und 1,2 M bis zum Erreichen einer OD₅₇₈ von 1-1,5 kultiviert. Ihre TreA-Reporterezymaktivität wurde bestimmt. Wie bereits für die Expression des *opuA* Operons aus *B. subtilis* beschrieben (Hoffmann *et al.*, 2013) ist aus diesem Experiment eine Erhöhung der *opuBA-treA* Transkription unter steigenden NaCl Konzentrationen zu beobachten (Abbildung 29). Ein Maximum der Expression wurde bei einer NaCl Konzentration von 0,9 M erreicht. Höhere Salinitäten führten zu keiner weiteren Steigerung der Transkriptionslevel (Abbildung 29). Entgegen der Erwartung auf Basis der Tilling Array Studien (Nicolas *et al.*, 2012) konnte auch für das *opuC* Operon eine osmotische Induktion unter kontinuierlichen Bedingungen

festgestellt werden. Im Bereich zwischen 0 und 0,3 M NaCl konnte hierbei eine Steigerung der Promotoraktivität von 149 ± 4 U mg Protein⁻¹ (SMM) auf 314 ± 15 U mg Protein⁻¹ (SMM mit 0,3 M NaCl) in Abhängigkeit von der extrazellulären Salinität verzeichnet werden. Bis zu einer NaCl Konzentration von 0,6 M konnte keine Veränderung der Transkriptionslevel festgestellt werden. Bei höheren Salinitäten kam es jedoch zu einer Reduktion der Promotoraktivität. Diese entsprach mit 189 ± 7 U mg Protein⁻¹ in etwa dem Ausgangslevel in Abwesenheit von NaCl (Abbildung 29), was mit den Daten der Tilling Array Studie von Nicolas *et al.* (2012) korreliert, in der in SMM und SMM mit 1,2 M NaCl vergleichbare *opuC* Expressionslevel detektiert werden konnten. Somit zeigt *opuC* ein Expressionsmuster, das von dem bekannter osmotisch induzierter Gene, wie zum Beispiel dem *proHJ*, *opuA* und *yqiHIK* Operonen aus *B. subtilis* abweicht (Brill *et al.*, 2011a; Fischer und Bremer, 2012; Hoffmann *et al.*, 2013).

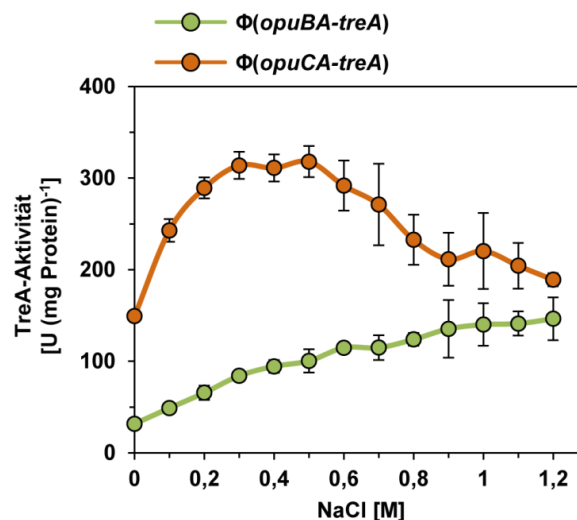


Abbildung 29 Expression von *opuB* und *opuC* in Abhängigkeit von unterschiedlichen extrazellulären Salinitäten.

Die Reportergenstämme STHB49 (*opuBA-treA*) und STHB33 (*opuCA-treA*) wurden in SMM mit den angegebenen NaCl Konzentrationen bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} 1-1,5) kultiviert und für die Bestimmung der TreA-Aktivität verwendet.

Um zu prüfen, ob die gesteigerte Expression von *opuB* und *opuC* spezifisch für erhöhte Konzentrationen an NaCl ist, oder ob die Induktion durch einen osmotischen Reiz im Allgemeinen erfolgt, wurden die Reportergenstämme Stämme STHB49 (*opuBA-treA*) und STHB33 (*opuCA-treA*) in SMM und in SMM mit erhöhter Osmolarität kultiviert. Hierbei wurden ionische (NaCl und KCl), sowie nicht-ionische Osmolyte (Saccharose) in isoosmolaren Konzentrationen getestet. Dabei betrug die Osmolarität von SMM 356 mosmo kg⁻¹ und zwischen 1100 und 1178 mosmo kg⁻¹ für SMM unter Zugabe der verschiedenen Osmolyte (Hoffmann *et al.*, 2013). Als Kontrolle diente Glycerin, da hierdurch zwar die Osmolarität des Mediums erhöht wird, Glycerin aber auf Grund seiner Membrangängigkeit

nicht osmotisch aktiv ist. In Übereinstimmung hiermit führte die Anwesenheit von Glycerin im Medium ($1100 \text{ mosmo kg}^{-1}$) zu keiner Steigerung der *opuB-treA* und *opuC-treA* Expressionslevel (Abbildung 29AB). Sowohl die *opuBA-treA* als auch die *opuCA-treA* Reporterfusion zeigte erhöhte Transkriptionslevel in Gegenwart von ionischen und nicht-ionischen Osmolyten (Abbildung 30AB). Es handelt sich demnach um eine allgemein osmotische Induktion. Auffallend ist jedoch die deutlich stärkere Transkription der *opuCA-treA* Fusion in Gegenwart des nicht-ionischen Osmolyts Saccharose (Abbildung 30B). Dass nicht-ionische Osmolyte zu einer stärkeren Expression führen als ionisch konnte bereits für die Promotoren von *opuA* (Hoffmann *et al.*, 2013) und *proHJ* (Brill *et al.*, 2011a) gezeigt werden.

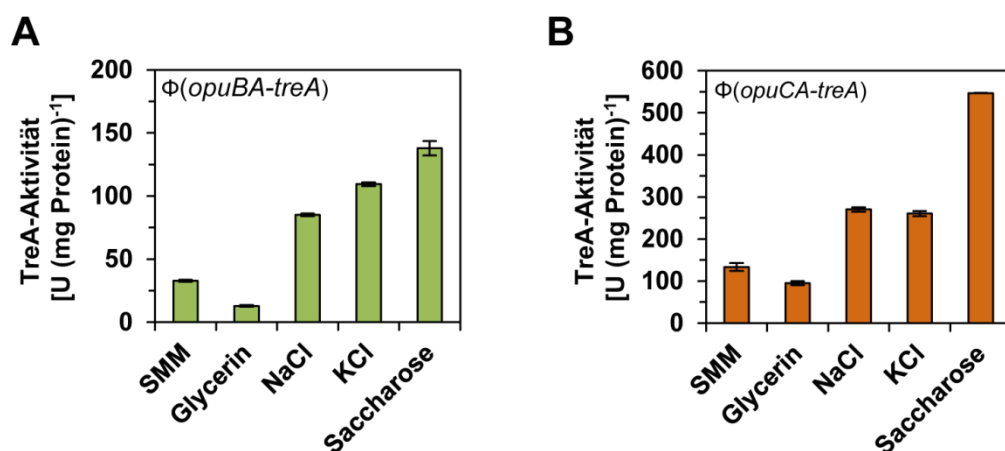


Abbildung 30 Osmotische Induktion der *opuB* und *opuC* Transkription.

Die *B. subtilis* Reportergermstämme **(A)** STHB49 (*opuBA-treA*) und **(B)** STHB33 (*opuCA-treA*) wurden in SMM oder SMM mit erhöhter Osmolarität kultiviert. Dabei betrug die Osmolarität von SMM $356 \text{ mosmo kg}^{-1}$. Medium mit erhöhter Osmolarität enthielt 0,68 M Glycerin ($1100 \text{ mosmo kg}^{-1}$), 0,4 M NaCl ($1188 \text{ mosmo kg}^{-1}$), 0,4 M KCl ($1178 \text{ mosmo kg}^{-1}$) oder 0,62 M Saccharose [$1118 \text{ mosmo kg}^{-1}$ (Hoffmann *et al.*, 2013)]. Bei Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase ($\text{OD}_{578} \text{ 1-1,5}$) wurden Aliquots der Kulturen durch Zentrifugation geerntet und für die Bestimmung der TreA-Aktivität verwendet.

15.2 Transkriptionelle Kontrolle der *opuB* und *opuC* Operone durch GbsR-Typ Regulatoren

Neben dem Repressor GbsR weist das Genom von *B. subtilis* Gene für zwei weitere GbsR-Typ Proteine auf. Angrenzend an das Operon für den Cholin Transporter OpuB ist das Gen für den YvaV Regulator zu finden. Das Gen für den GbsR-Typ Regulator OpcR befindet sich in der unmittelbaren Gennachbarschaft des *opuC* Operons (Kappes *et al.*, 1999; Nau-Wagner *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013). Eine bioinformatische Analyse der Genome von Vertretern der Gattung *Bacillus* zeigte, dass die Assoziation der beiden Transporter mit ihren jeweiligen GbsR-Typ Regulatoren stark konserviert ist (Abbildung 53). Während die Funktion von YvaV unbekannt ist, konnte für den Regulator OpcR bereits gezeigt werden, dass er als

Repressor der *opuC* Expression agiert. In Abwesenheit von GbsR konnte zudem ein negativer Einfluss auf die *opuB* Transkription festgestellt werden (Lee *et al.*, 2013). Im Gegensatz zu GbsR (Nau-Wagner *et al.*, 2012) ist ein möglicher Induktor für OpcR nicht bekannt (Lee *et al.*, 2013). Durch Verkürzungen der entsprechenden Promotorregionen konnte mit Hilfe von DNA-Bindestudien die Position der OpcR Operatorsequenz auf einen Bereich von 38 Basenpaare eingegrenzt werden. Ein „inverted repeat“ innerhalb dieses Bereichs, der mit der -35 Region der SigA Promotoren überlappt wurde als OpcR Bindestelle vorgeschlagen [Abbildung 31 (Lee *et al.*, 2013)].

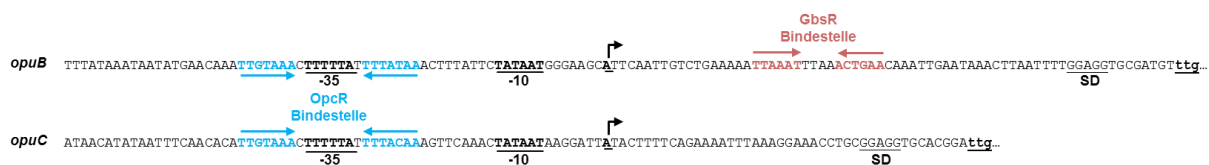


Abbildung 31 DNA Bindestellen der Regulatoren GbsR und OpcR.

Dargestellt sind die Promotorregionen des *opuB* und *opuC* Operons. Die GbsR Bindestelle des *opuB* Operons ist durch rote Pfeile gekennzeichnet, während die OpcR Bindestellen (Lee *et al.*, 2013) durch blaue Pfeile markiert werden. Die -35 und die -10 Region der SigA Promotoren, der Transkriptionsstart (gebogener Pfeil) und die Shine-Dalgarno Sequenz (SD) sind hervorgehoben. Der Transkriptionsstart der *opuB* mRNA wurde experimentell bestimmt (Kappes *et al.*, 1999). Der Promotor des *opuC* Operons wurde hiervon abgeleitet (Nau-Wagner *et al.*, 2012).

Um die Repression durch OpcR zu bestätigen und eine mögliche Rolle des YvaV Regulators zu identifizieren wurden Reporterstudien mit den Promotorregionen des *opuB* und des *opuC* Operons durchgeführt. Der *opuBA-treA* Reporterstamm STHB49 und hiervon abgeleitete Mutanten mit Deletionen der *gbsR*-Typ Gene *gbsR*, *opcR* und *yvaV* wurden in SMM und SMM mit 1,2 M NaCl kultiviert. Bei Erreichen einer OD_{578} von 1-1,5 wurden Aliquots der Kulturen durch Zentrifugation geerntet und für die Bestimmung der TreA Reporterenzym Aktivität verwendet. Im Wildtyp Hintergrund kann in Gegenwart von 1,2 M NaCl eine Induktion der *opuBA-treA* Transkription festgestellt werden. Wie bereits durch die Analysen von Nau-Wagner *et al.* (2012) bekannt konnte eine Repression der *opuBA-treA* Expression durch GbsR festgestellt werden. Hierbei sind bereits in Abwesenheit von NaCl 10-fach erhöhte Expressionslevel im Vergleich zum Wildtyp zu verzeichnen. Diese wurden in Gegenwart von osmotischem Stress zusätzlich gesteigert (Abbildung 32). Im Gegensatz zu den Beschreibungen von Lee *et al.* (2013) konnte auch in Gegenwart von GbsR eine negativer Einfluss auf die *opuBA-treA* Expression durch den Regulator OpcR festgestellt werden. Die Expressionslevel des *opcR* Deletionsstamms waren im Vergleich zum Wildtyp Stamm um das 4-fache erhöht. Dieser Einfluss zeigte sich jedoch nur unter hyperosmolaren Bedingungen, während die Expressionslevel in Abwesenheit von NaCl unverändert blieben (Abbildung 32). Die Analyse eines Reporterstammes mit simultaner Deletion des *gbsR* und

des *opcR* Gens zeigte, dass die beiden GbsR-Typ Regulatoren additiv agieren um die Expression des *opuB* Operons zu reprimieren (Abbildung 32). Eine Deletion von *yvaV* zeigte keinen Einfluss auf die *opuBA-treA* Expressionslevel. Dies war auch der Fall, wenn die *yvaV* Deletion mit Deletionen der anderen GbsR-Typ Regulatoren kombiniert wurde (Abbildung 32).

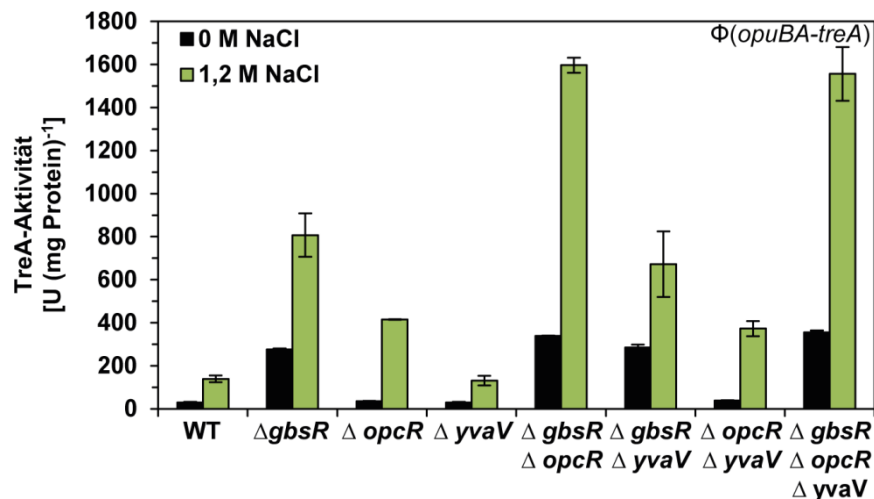


Abbildung 32 Regulation der *opuB* Expression durch die GbsR-Typ Regulatoren GbsR, OpcR und YvaV.

Die *opuBA-treA* Reporterstämme wurden in SMM oder SMM mit 1,2 M NaCl kultiviert. Aliquots von Kulturen mit einer OD₅₇₈ zwischen 1 und 1,5 wurden für die Aktivitätsbestimmung des Reporterenzym TreA genutzt.

Bei der Analyse der Regulation des *opuC* Operons durch die GbsR-Typ Proteine wurde analog zu der soeben beschriebenen Vorgehensweise verfahren. Hierbei wurde jedoch eine NaCl Konzentration von 0,4 M gewählt, um die maximale Induktion der *opuCA-treA* Expression zu gewährleisten (Abbildung 29). Dabei konnte die Funktion von OpcR als Repressor der *opuC* Expression bestätigt werden [Abbildung 33 (Lee *et al.*, 2013)]. Im Gegensatz zum *opuB* Operon (Abbildung 32) ist bereits in Abwesenheit von NaCl ein Einfluss durch OpcR zu erkennen. Die Expressionslevel sind hier um das 2,3-fache erhöht. Dennoch konnte weiterhin eine osmotische Induktion der *opuCA-treA* Expression verzeichnet werden (Abbildung 33). In *gbsR* und *yvaV* Deletionsstämmen zeigte sich keine Veränderung der *opuCA-treA* Transkription (Abbildung 33). Die *opuC* Expression ist somit, im Gegensatz zu der Transkription des *opuB* Operons, durch einen einzigen GbsR-Type Regulator bestimmt.

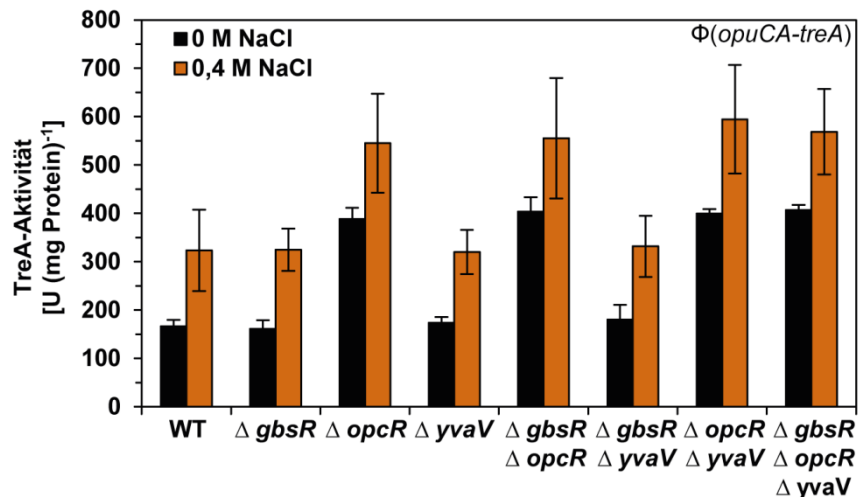


Abbildung 33 Regulation der *opuC* Expression durch die GbsR-Typ Regulatoren GbsR, OpcR und YvaV.

Die *opuCA-treA* Reporterstämme wurden in SMM und SMM mit 0,4 M NaCl bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} 1-1,5) kultiviert. Aliquots der Kulturen wurden zentrifugiert und für die Bestimmung der TreA-Aktivität eingesetzt.

Die beiden verwandten Gencluster *opuB* und *opuC* teilen sich die Regulation durch den GbsR-Typ Repressor OpcR. In beiden Fällen ist durch die vorangegangene Studie von Lee *et al.* (2013) und die hier dargelegten Daten ersichtlich, dass die osmotische Induktion beider Operone nicht durch OpcR und GbsR vermittelt wird. Der unterschiedliche Einfluss auf die Expression des *opuB* und des *opuC* Genclusters in der Abwesenheit von osmotischen Stress, kann durch die zusätzliche Repression der *opuB* Transkription durch GbsR erklärt werden.

16 OpcR – Hochsalz-Repressor der *opuC* Expression

Obwohl die reprimierende Funktion des Regulators OpcR in *B. subtilis* bereits im Jahr 2013 beschrieben wurde (Lee *et al.*, 2013) konnte seine physiologische Funktion bisher nicht geklärt werden. In Anbetracht des ungewöhnlichen Expressionsmusters des *opuC* Operons in Antwort auf steigende extrazelluläre Salinitäten (Abbildung 29) soll im Folgenden eine Beteiligung von OpcR an der reduzierten Transkription von *opuC* unter hochosmolaren Bedingungen untersucht werden.

Die *opuCA-treA* Reporterstämme STHB33 (WT) und STHB35 ($\Delta opcR$) wurden hierfür in SMM mit steigenden NaCl Konzentrationen zwischen 0 und 1,2 M kultiviert. Bei Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} 1-1,5) wurden die Kulturen mittels Zentrifugation geerntet und für die Bestimmung der TreA Aktivität verwendet. Die hieraus resultierenden Daten sind in Abbildung 34 zusammengefasst. Auffällig ist, dass es in Abwesenheit des OpcR Repressors nicht nur zu einer generellen Erhöhung der *opuCA-treA* Expression kommt, sondern auch zu einer drastischen Veränderung des

Expressionsmusters. Während die Transkriptionslevel in Anwesenheit von OpcR unter hohen Osmolaritäten (0,6–1,2 M NaCl) abnahmen, war in dem *opcR* Deletionsstamm eine weitere Steigerung der *opuCA-treA* Transkription zu verzeichnen. Ab einer NaCl Konzentration von 0,9 M kam es zu keiner weiteren Zunahme der Promotoraktivität (Abbildung 34). Dieses Expressionsmuster ist mit denen des *opuB* Operons (Abbildung 29) und des *opuA* Operons (Hoffmann *et al.*, 2013) vergleichbar. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass OpcR für die Reetablierung der *opuC* Repression in Gegenwart von hohen Osmolaritäten verantwortlich ist und somit als Hochsalz-Repressor der *opuC* Expression fungiert.

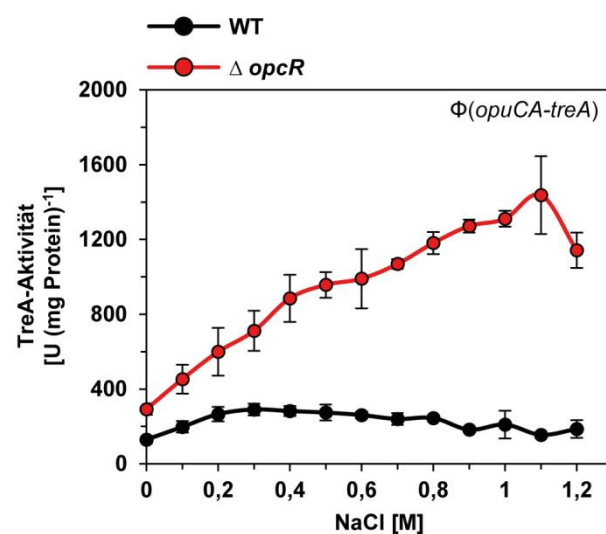


Abbildung 34 OpcR-abhängige Repression der *opuC* Expression unter hochosmolaren Bedingungen.

Die *opuCA-treA* Reporterstämme STHB33 (WT) und STHB35 (Δ *opcR*) wurden in SMM mit den angegebenen NaCl Konzentrationen bis zum Erreichen der OD₅₇₈ 1-1,5 kultiviert und für die Bestimmung der TreA-Aktivität verwendet.

Ein erster Ansatz für das Verständnis des Mechanismus der OpcR-abhängigen Repression der *opuC* Expression unter starkem Salzstress konnte in den Tilling Array Analysen von Nicolas *et al.* (2012) gefunden werden. Hier wurden die höchsten Expressionslevel von *opcR* in Gegenwart von 1,2 M NaCl detektiert (Nicolas *et al.*, 2012). Um zu klären, ob eine osmotische Induktion der *opcR* Transkription zugrunde liegt, wurde eine *opcR-treA* Reportergenfusion konstruiert und in den *amyE* Genlocus von *B. subtilis* GNB37 (Δ *treA*) integriert. Der resultierende Stamm, BWB127 (*opcR-treA*), wurde in SMM mit steigenden NaCl Konzentrationen kultiviert und auf seine TreA-Reporterenzymaktivität getestet. Hierbei ist zu erkennen, dass die *opcR-treA* Expression in einem linearen Zusammenhang mit der extrazellulären NaCl Konzentration steht. Wie für ein regulatorisches Gen zu erwarten, erfolgt die *opcR* Expression auf niedrigem Niveau. Bei steigenden Salinitäten fand eine

verstärkte Transkription statt, wobei eine 2-fache Induktion von 15 U mg Protein⁻¹ (SMM) auf 34 U mg Protein⁻¹ (SMM mit 1,2 M NaCl) beobachtet werden konnte (Abbildung 35A). Das Expressionsmuster von *opcR* steht somit im Einklang mit der Funktion des Regulators als Hochsalz-Repressor des *opuC* Operons.

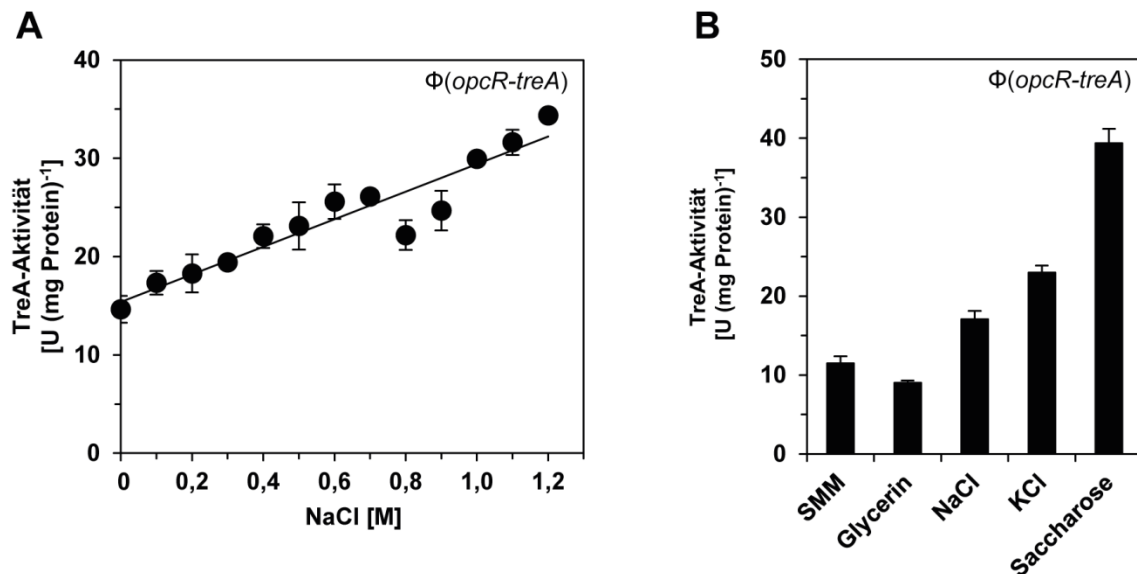


Abbildung 35 Expression von *opcR* in Abhängigkeit von extrazellulären Osmolyten.

(A) Expression von *opcR* in Abhängigkeit von unterschiedlichen extrazellulären Salinitäten. Der Reporterstamm BWB127 (*opcR-treA*) wurden in SMM mit NaCl Konzentrationen von 0 bis 1,2 M bis zum Erreichen der OD₅₇₈ 1-1,5 kultiviert und für die Bestimmung der TreA-Aktivität verwendet. **(B)** Osmotische Induktion der *opcR* Transkription. Das Wachstum des Reporterstamms BWB127 (*opcR-treA*) erfolgte in SMM, sowie in SMM mit erhöhter Osmolarität. Dabei betrug die Osmolarität von SMM 356 mosmo kg⁻¹. Medium mit erhöhter Osmolarität enthielt 0,68 M Glycerin (1100 mosmo kg⁻¹), 0,4 M NaCl (1188 mosmo kg⁻¹), 0,4 M KCl (1178 mosmo kg⁻¹) oder 0,62 M Saccharose [1118 mosmo kg⁻¹ (Hoffmann *et al.*, 2013)]. Bei Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD₅₇₈ 1-1,5) wurden Aliquots der Kulturen durch Zentrifugation geerntet und für die Bestimmung der TreA-Aktivität verwendet.

Erhöhte Transkriptionslevel in Gegenwart von hohen Salinitäten konnten auch für *cosR* aus *Vibrio cholerae* gezeigt werden (Shikuma *et al.*, 2013). CosR gehört zu der Familie der MarR-Typ Regulatoren und agiert als Repressor des angrenzenden *opuD* Gens sowie der *ectABC-ask* Gene, die Enzyme für die Synthese des kompatiblen Soluts Ectoin kodieren. Durch weiterführende Experimente konnte jedoch gezeigt werden, dass die Transkription von *cosR* nicht durch hohe Osmolaritäten, sondern durch die Ionenstärke kontrolliert wird (Shikuma *et al.*, 2013). Um die Frage zu beantworten ob dies auch der Fall für *opcR* ist, wurde der Stamm BWB127 (*opcR-treA*) in SMM und in SMM mit erhöhter Osmolarität kultiviert. Um zwischen einer osmotischen Induktion und einer Induktion durch erhöhte Ionenstärke zu unterscheiden, wurden NaCl und KCl als ionische Osmolyte sowie Saccharose als nicht-ionisches Osmolyt getestet. Abbildung 35B zeigt, dass die Erhöhung der Osmolarität durch ionische Osmolyte zu ähnlichen Transkriptionsleveln führt. In Gegenwart von Saccharose

war, wie bereits für *opuC* (Abbildung 30B) gezeigt, eine deutlich verstärkte Expression zu erkennen. Im Gegensatz zu der Expression von *cosR* (Shikuma *et al.*, 2013) handelt es sich hierbei tatsächlich um eine rein osmotische Induktion der *opcR* Transkription.

16.1 Autoregulation der *opcR* Expression

Eine Eigenschaft, die bei Mitgliedern der MarR-Typ Familie von transkriptionellen Regulatoren häufig vorkommt ist ihre autoregulatorische Funktion (Aleksun und Levy, 1997; Evans *et al.*, 2001; Galán *et al.*, 2003; Grove, 2013; Gupta *et al.*, 2019). Um zu prüfen, ob auch OpcR diese Eigenschaft aufweist wurden die Transkriptionslevel der *opcR-treA* Reporterfusion in einem *opcR* Deletionsstamm (BWB131) analysiert. Darüber hinaus wurde auch ein möglicher Einfluss der verwandten Regulatoren GbsR und YvaV (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Ronzheimer *et al.*, 2018) auf die Transkription des *opcR* Gens untersucht. Die entsprechenden Stämme wurden in SMM und SMM mit 1,2 M NaCl kultiviert und bei Erreichen einer OD_{578} von 1-1,5 durch Zentrifugation geerntet. Im Anschluss wurde die TreA-Enzymaktivität der Zellen getestet.

Hierbei war, in Abwesenheit von osmotischem Stress, im *opcR* Deletionsstamm keine Veränderung der Expressionslevel zu erkennen. Unter hyperosmolaren Bedingungen konnte jedoch eine um das 2-Fache erhöhte Transkriptionsaktivität im Vergleich zum Wildtyp Stamm festgestellt werden (Abbildung 36). Eine Autorepression der *opcR* Expression findet somit unter hochosmolaren Bedingungen statt. Unter den getesteten Bedingungen ließ sich keine Regulation von *opcR* durch GbsR oder YvaV erkennen. Die entsprechenden Deletionsstämme zeigten die gleichen Expressionslevel wie der Wildtyp Stamm (Abbildung 36).

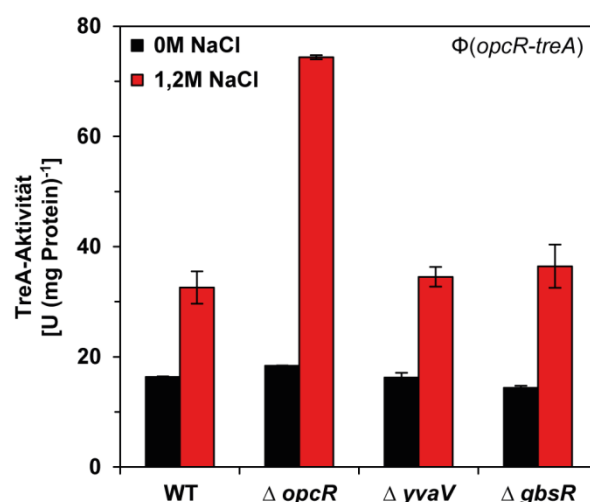


Abbildung 36 Autoregulation der *opcR* Expression.

Die *opcR-treA* Reporterstämme BWB127 (WT), BWB130 (Δ*gbsR*), BWB131 (Δ*opcR*) und BWB132 (Δ*yvaV*) wurden in SMM und SMM mit 1,2 M NaCl bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} 1-1,5) kultiviert. Aliquots der Kulturen wurden durch Zentrifugation geerntet. Ihre TreA-Aktivität wurde bestimmt.

16.2 Analyse der Struktur des OpcR Repressors

In den Vorangegangenen Abschnitten dieser Arbeit konnte für die zwei GbsR-Typ Proteine GbsR aus *B. subtilis* [Abbildung 9 (Nau-Wagner *et al.*, 2012)] und OpuAR aus *B. infantis* [Abbildung 28 (Ronzheimer *et al.*, 2018)] bereits ein homodimerer Aufbau gezeigt werden. Um zu Prüfen, ob es sich bei der funktionellen Einheit des OpcR Proteins ebenfalls um einen Dimer handelt, wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt.

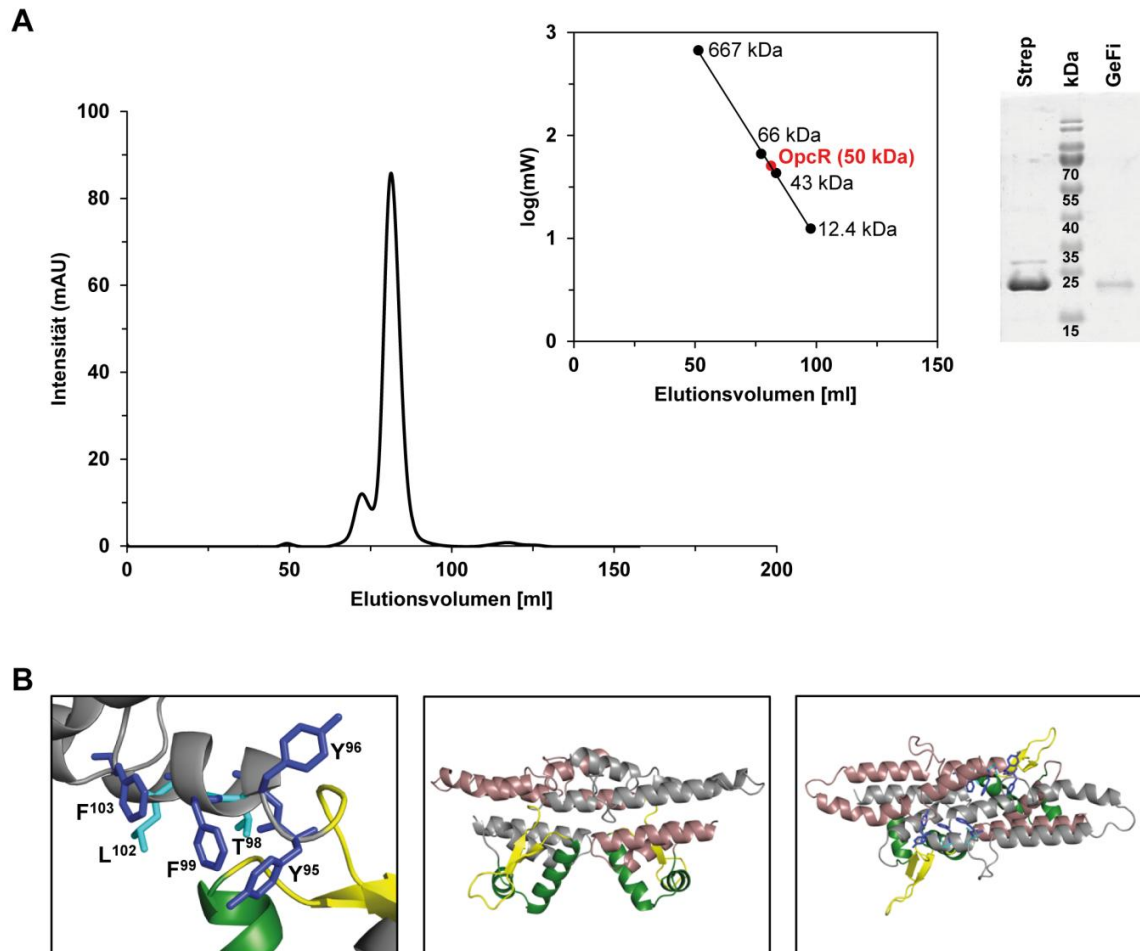


Abbildung 37 Größenausschlusschromatographie und *in silico* Modell des OpcR Proteins aus *B. subtilis*.

(A) Unmittelbar nach der Reinigung des OpcR Proteins wurden 2 ml der Proteinlösung ($1,1 \text{ mg ml}^{-1}$) auf eine Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg) aufgetragen. Der verwendete Puffer enthielt 100 mM KPP (pH 8) und 300 mM NaCl. Für die Kalibrierung der Säule wurden Thyroglobulin (667 kDa), Rinderserum Albumin (66 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Cytochrom C eines Pferdeherzens (12,4 kDa) als Referenzproteine verwendet. Die Reinheit, sowie die Molekularmasse von OpcR wurden im Anschluss an die Aufreinigung und die Größenausschlusschromatographie mittels SDS-Gel (15%) analysiert. (B) *In silico* Modell des OpcR Dimers auf Basis des DNA-bindenden Proteins Mj223 aus *M. jannaschii* [PDB 1KU9 (Ray *et al.*, 2003)] und Darstellung der putativen Ligandenbindestelle. Die beiden Monomere sind in grau und rot dargestellt. Das Helix-Turn-Helix Motiv des DNA-Lesekopfs (grün), der flexible Linker (gelb) und die putative Ligandenbindetasche (blau) sind farblich gekennzeichnet. Die zwei Aminosäuren der putativen Aromatenbindebox, die von der Architektur des GbsR Proteins aus *B. subtilis* (Nau-Wagner *et al.*, 2012) abweichen (T⁸⁸ und L¹⁰²) sind in hellblau markiert.

Das hieraus resultierende Chromatogramm ist in der Abbildung 37A dargestellt. Zu erkennen ist ein deutlicher Peak bei einem Elutionsvolumen von 81 ml. Dies zeigt ein Protein mit einer

molekularen Masse von 50 kDa an. Da das OpcR-Strep-Tag Fusionsprotein eine molekulare Masse von 23 kDa aufweist, liegt auch OpcR als Dimer vor. Linksseitig dieses Peaks ist eine kleine Schulter zu sehen. Diese könnte auf einen geringen Anteil an aggregierten Protein hindeuten (Abbildung 37A). Ein Peak an dieser Position entspricht einem Protein von 112 kDa.

Das Protein OpcR weist eine Sequenzidentität von 34% mit GbsR aus *B. subtilis* auf (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Bei der Inspektion der Sequenzen (Abbildung 51), sowie eines OpcR *in silico* Models auf der Basis des Protein Mj223 aus *M. jannaschii* [PDB 1KU9 (Ray *et al.*, 2003)], ist eine Gruppe von Aminosäuren auffällig die eine aromatische Ligandenbindebox ähnlich zu der in GbsR [Abbildung 14D (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Ronzheimer, 2015)] bilden könnten (Abbildung 37B). Während die putative Ligandenbindebox des GbsR Proteins aus sechs aromatischen Aminosäureresten aufgebaut ist, enthält die des OpcR Proteins nur vier solcher Aminosäuren (Abbildung 37B). Diese Aminosäurereste könnten der Bindung einer Trimethylammoniumgruppe dienen, wie sie viele kompatible Solute aufweisen. Ein tatsächlicher Ligand, der als Induktor agiert und auf diese Weise die OpcR-vermittelte Repression aufhebt ist jedoch nicht bekannt.

17 RemA – Verknüpfung zwischen der Antwort auf osmotischen Stress und Biofilmbildung

Das kleine Protein RemA (89 AS) wurde im Rahmen eines Suppressorscreens als Aktivator der Gene für die Biofilm Matrix Synthese identifiziert (Winkelman *et al.*, 2009). In einer anschließenden Transkriptomstudie konnte gezeigt werden, dass das RemA Regulon neben den Genen für die Synthese der Biofilm Matrix auch diejenigen für den OpuA, OpuB und OpuC Transporter beinhaltet (Winkelman *et al.*, 2013), die der Aufnahme von kompatiblen Soluten dienen (Hoffmann und Bremer, 2017). Es sollte nun die Bedeutung des Biofilm Aktivators RemA für das regulatorische Netzwerk des *opuB* und *opuC* Operons untersucht werden. Die hierfür verwendeten *opuBA-treA* und *opuCA-treA* Reporterstämme trugen Deletionen des *remA* Gens. Des Weiteren wurden Stämme genutzt die zusätzliche Deletionen der GbsR-Typ Regulatoren GbsR, OpcR und YvaV (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013) aufwiesen. Stämme die eine *opuBA-treA* Reporterengenfusion enthielten wurden wie zuvor beschrieben in SMM und SMM mit 1,2 M NaCl kultiviert, während für Stämme mit einer *opuCA-treA* Fusion eine NaCl Konzentration von 0,4 M gewählt wurde.

Die Analysen der Transkriptionslevel des *opuB* Operons sind der Abbildung 38 zu entnehmen. Eine deutliche Reduktion der Expressionslevel war in Abwesenheit von RemA zu erkennen. Während der Wildtyp Stamm unter ungestressten Bedingungen TreA-Aktivitäten von 29 ± 3 U mg Protein⁻¹ aufwies, zeigt der *remA* Deletionsstamm nur noch

Aktivitäten von 5 ± 1 U mg Protein⁻¹. Die Promotoraktivität wurde zudem nur noch in einem sehr geringen Maß durch osmotischen Stress gesteigert [13 ± 2 U mg Protein⁻¹ (Abbildung 38)]. Somit konnte die Funktion von RemA als Aktivator der *opuB* Expression bestätigt werden. Die Kritische Funktion von RemA wird dadurch verdeutlicht, dass auch in Abwesenheit des Repressors OpcR keine Verstärkung der *opuBA-treA* Transkription in einer *remA* Mutante festgestellt werden konnte (Abbildung 38). Geringfügig höhere Expressionslevel konnten im Fall einer zusätzlichen *gbsR* Deletion verzeichnet werden. Diese erreichten mit 48 ± 8 U mg Protein⁻¹ jedoch nur 35% der Wildtyp Aktivität (Abbildung 38).

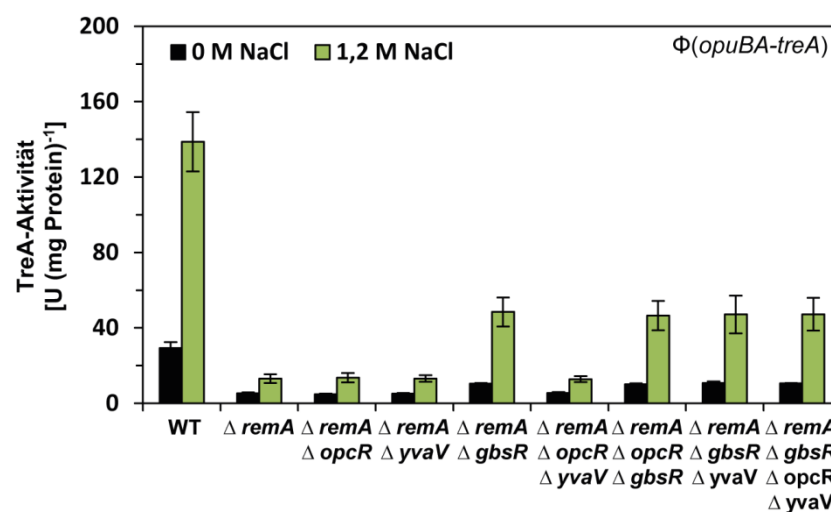


Abbildung 38 Regulation der *opuB* Expression durch den Biofilm Aktivator RemA.

B. subtilis Stämme, mit einer *opuBA-treA* Reporterfusion und den angegebenen Deletionen der Regulatoren RemA, GbsR, OpcR und YvaV wurden in SMM und SMM mit 1,2 M NaCl kultiviert. Bei Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} 1-1,5) wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und in einem TreA-Enzymassay eingesetzt.

Ein ähnliches Bild zeigte sich auch in der Analyse der *opuCA-treA* Expressionslevel. In Abwesenheit des Regulators RemA erreichten die Transkriptionslevel von Zellen die in SMM kultiviert wurden nur 18% des Wildtyp Levels. Eine osmotische Induktion der Expression war nicht mehr zu erkennen (Abbildung 39). Eine Simultane Deletion des Repressors OpcR ließ keine Steigerung der Transkriptionslevel zu (Abbildung 39). Somit ist die Aktivierung durch RemA essentiell für die *opuC* Expression.

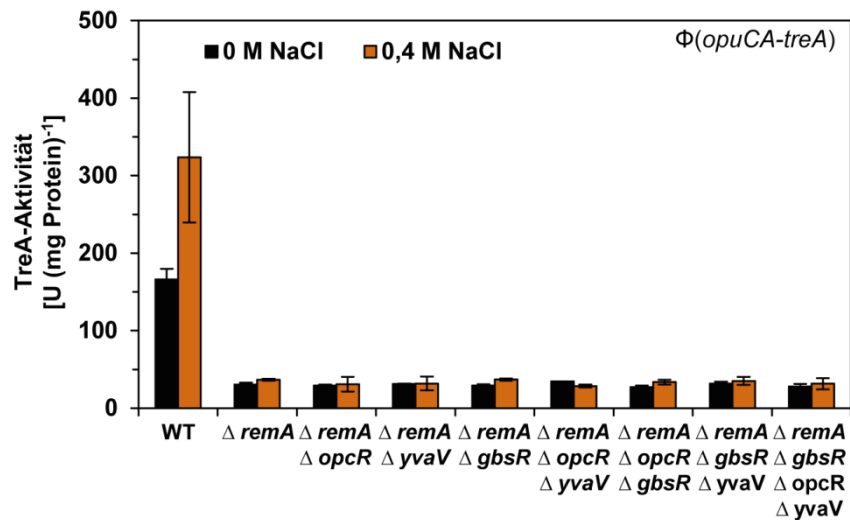


Abbildung 39 Regulation der *opuC* Expression durch den den Aktivator RemA.

B. B. subtilis opuCA-treA Reporterstämme mit den angegebenen Deletionen der Regulatoren RemA, GbsR, OpcR und YvaV wurden in SMM und SMM mit 0,4 M NaCl bis zum Erreichen einer OD₅₇₈ von 1-1,5 kultiviert. Die Zellen durch Zentrifugation geerntet und ihre TreA Reporterenzym Aktivität wurde bestimmt.

Neben den Biofilm Matrix Genen und dem *OpuA*, *OpuB* und *OpuC* Operonen zeigte die Transkriptomstudie von Winkelmann *et al.* (2013) zudem eine Aktivierung der Expression von *opcR*. Der Vergleich der Transkriptionslevel einer *remA* Mutante und einem Stamm mit intaktem *remA* Gen zeigte eine 4,6-fache Veränderung der Expression von *opcR* in Abwesenheit des Aktivators RemA (Winkelmann *et al.*, 2013).

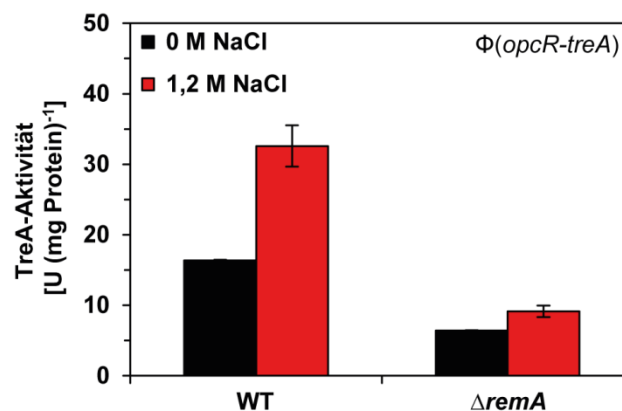


Abbildung 40 Aktivierung der *opcR* Expression durch RemA.

Die *opcR-treA* Reporterstämme BWB127 (WT) und BWB129 (Δ*remA*) wurden in SMM und SMM mit 1,2 M NaCl bis zu einer OD₅₇₈ von 1-1,5 kultiviert und die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet. Es erfolgte die anschließende Bestimmung der TreA-Aktivität.

Die Funktion von RemA als Aktivator der *opcR* Expression konnte durch die Verwendung einer *opcR-treA* Reporterfusion bestätigt werden. Wie für das *opuB* und *opuC* Operon

beschrieben lassen sich in Abwesenheit von RemA reduzierte Expressionslevel in osmotisch nicht gestressten Zellen verzeichnen. Während im Wildtyp Hintergrund *opcR-treA* Expressionslevel von 16 U mg Protein⁻¹ verzeichnet wurden, zeigte der *remA* Deletionsstamm TreA-Aktivitäten von 6 U mg Protein⁻¹ (Abbildung 40). Eine Stimulation der Transkriptionsaktivität in osmotisch gestresste Zellen war nicht zu erkennen (Abbildung 40).

18 Synthese des kompatiblen Soluts Arsenobetain aus dem Vorläufer Arsenocholin

Arsen ist ein verbreiteter Bestandteil der Erdkruste sowie der Biosphäre (Mukhopadhyay *et al.*, 2002; Oremlund und Stolz, 2003; Li *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2017). Darüber hinaus tragen durch den Menschen verursachte Quellen, wie die Produktion von Farben und Lacken oder die Verwendung von Arsen-basierten Pestiziden, zu der Verbreitung von Arsen in der Umwelt bei (Oremlund und Stolz, 2003). In Anbetracht der weiten Verbreitung dieser toxischen Substanz ist es nicht verwunderlich, dass Mikroorganismen unterschiedliche Mechanismen der Detoxifikation und Resistenz entwickelt haben (Slyemi und Bonnefoy, 2012; Zhao, 2016; Edwardson und Hollibaugh, 2017; Chen *et al.*, 2017b). Sie haben zudem Stoffwechselwege für die Energiegewinnung aus organischen und anorganischen Arsen-haltigen Substanzen entwickelt (Ahmann *et al.*, 1994; Laverman *et al.*, 1995; Stolz *et al.*, 1999; Oremlund *et al.*, 2002; Oremlund und Stolz, 2003).

Die Toxizität Arsen-haltiger Verbindungen ist seit der Antike bekannt (Nriagu, 2002). Eine Ausnahme hiervon stellt die organische Arsenverbindung Arsenobetain dar (Kaise *et al.*, 1985). Arsenobetain ist weit verbreitet in marinen Ökosystemen und gelangt durch den Verzehr von Meeresfrüchten in den menschlichen Organismus (Molin *et al.*, 2015; Thomas und Bradham, 2016; Taylor *et al.*, 2017).

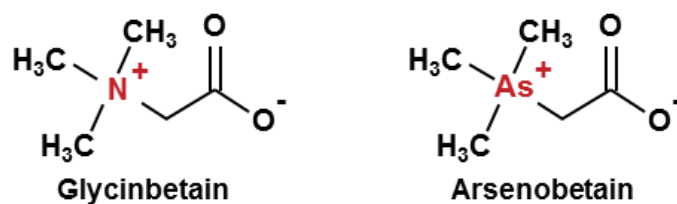


Abbildung 41 Strukturformeln von Glycinebetain und Arsenobetain.

Durch die chemische Ähnlichkeit Arsenobetains mit dem Stickstoff-haltigem Glycinebetain (Abbildung 41) wurde bereits eine osmoregulatorische Wirkung von Arsenobetain vermutet (Peddie *et al.*, 1994; Ciulla *et al.*, 1997; Devesa *et al.*, 2005; Nearing *et al.*, 2015; Popowich *et al.*, 2016), aber nie experimentell bewiesen.

18.1 Die osmoprotektive Wirkung von Arsenobetain in *B. subtilis*

Arsenobetain übt in *B. subtilis* sowohl eine osmoprotektive als auch eine zytoprotektive Funktion gegen niedrige und hohe Wachstumstemperaturen aus. Ebenso wie Glycinbetain wird Arsenobetain über die Transporter OpuA, OpuC und OpuD in die Zelle aufgenommen. Diese Transporter weisen jedoch eine schlechtere Affinität für Arsenobetain als für Glycinbetain auf (Hoffmann *et al.*, 2018). Eine protektive Wirkung unter hochosmolaren Bedingungen konnte auch in Gegenwart von Arsenocholin beobachtet werden. Wachstumsexperimente mit einem Deletionsstamm, dem die kodierenden Gene (*gbsAB*) für die enzymatische Umsetzung von Cholin zu Glycinbetain fehlen (Boch *et al.*, 1996), zeigten einen Verlust der Protektiven Funktion von Arsenocholin (Hoffmann *et al.*, 2018). Die hierdurch vermutete Umwandlung von Arsenocholin in Arsenobetain sollte nun mit Hilfe von ^{13}C -NMR Spektren überprüft werden. Hierfür wurden der *B. subtilis* Wildtyp Stamm JH642 (Smith *et al.*, 2014) und der *proHJ* Deletionsstamm JSB8, der nicht mehr zur osmoadaptiven Prolin-Synthese in der Lage ist verwendet (Brill *et al.*, 2011a). Ihre Kultivierung erfolgte in SMM mit 1,2 M NaCl und 1 mM der kompatiblen Solute Glycinbetain, Arsenobetain, Cholin oder Arsenocholin. Die entsprechenden Reinsubstanzen dienten als Referenz.

Bei Betrachtung der Referenzspektren fällt die starke Ähnlichkeit zwischen dem Arsenobetain und dem Arsenocholin Spektrum auf. Dieses resultiert aus der gleichen Grundstruktur, die eine Trimethylarsengruppe enthält. Ein deutliches Unterscheidungsmerkmal liefern der Peak bei 175 ppm, der die Carboxylgruppe des Arsenobetains repräsentiert und der Peak bei 69 ppm im Spektrum von Arsenocholin, der die Alkoholgruppe repräsentiert (Abbildung 42GH). In Zellen, die in Gegenwart von Arsenobetain wuchsen, ließ sich dieses in unmodifizierter Form detektieren (Abbildung 42D). Ebenso war dies der Fall, für Zellen die in Gegenwart von Glycinbetain kultiviert wurden (Abbildung 42C).

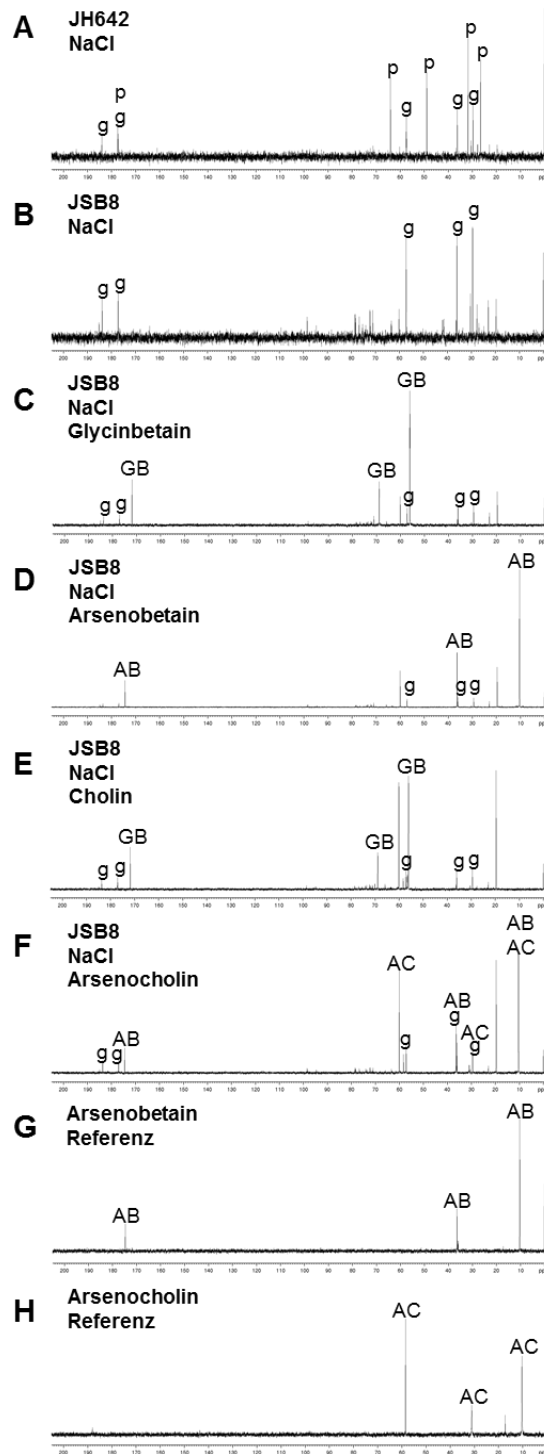


Abbildung 42 Qualitative Identifizierung von Glycinbetain, Arsenobetain, Cholin und Arsenocholin durch ^{13}C -NMR Spektren.

Dargestellt sind ^{13}C -NMR Spektren des *B. subtilis* Wildtyp Stammes JH642 und des *proHJ* Deletionsstammes JSB8. Die Stämme wurden in SMM mit 1,2 M NaCl in (A, B) Abwesenheit von kompatiblen Soluten, oder in Anwesenheit von (C) 1 mM Glycinbetain, (D) 1 mM Arsenobetain, (E) 1 mM Cholin oder (F) 1 mM Arsenocholin kultiviert. Die ^{13}C -NMR Spektren von (G) Arsenobetain und (H) Arsenocholin sind als Referenz dargestellt. Die Resonanzsignale von Glycinbetain (GB), Arsenobetain (AB), Arsenocholin (AC), Glutamat (g) und Prolin (p) sind markiert. Der Wildtyp Stamm JH642 wurde in SMM mit 1,2 M NaCl kultiviert (A) und dient als Referenz für die Detektion von Glutamat und Prolin.

Erfolgte die Anzucht in Gegenwart von Arsenocholin, konnten sowohl die Resonanzsignale für Arsenocholin als auch für Arsenobetain in den Zellextrakten detektiert werden, wodurch die enzymatische Umsetzung von Arsenocholin in Arsenobetain bestätigt werden konnte (Abbildung 42F). Jedoch erfolgt diese Umwandlung anscheinend nicht mit der gleichen Effizienz wie im Fall der Glycinbetain Synthese aus Cholin. In Zellen, die in Anwesenheit von Cholin kultiviert wurden, konnte kein Cholin mehr nachgewiesen werden. Hier ließ sich ausschließlich Glycinbetain vorfinden (Abbildung 42E).

Auf Basis der ^{13}C -NMR Analysen lässt sich keine Aussage darüber treffen, in welchem Verhältniss Arsenocholin und Arsenobetain in den Zellen vorliegen. Daher wurde die quantitative Analyse der intrazellulären kompatiblen Solute mittels ^{13}C -NMR Spektren um eine qualitative Bestimmung der entsprechenden Poolgrößen erweitert. Hierfür erfolgte eine Messung der intrazellulären Konzentrationen an Glycinbetain, Arsenobetain, Cholin und Arsenocholin mittels LC-ESI-MS in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Andreas Seubert (Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg, DE). Der *B. subtilis* Stamm JH642 wurde hierbei in SMM oder SMM mit 1,2 M NaCl in Gegenwart von 1 mM der kompatiblen Solute kultiviert.

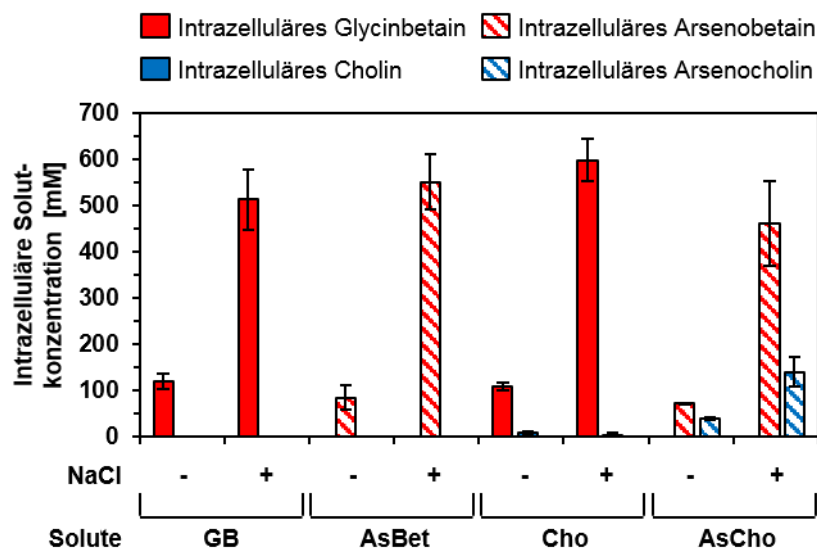


Abbildung 43 Intrazelluläre Akkumulation von Glycinbetain, Arsenobetain, Cholin und Arsenocholin in Antwort auf hohe Salinitäten.

Der *B. subtilis* Stamm JH642 wurde in SMM oder SMM mit 1,2 M NaCl in der Gegenwart der angegebenen Solute (1 mM) bis zu einer OD_{578} von 2-2,5 kultiviert. Die Solute wurden durch 80% (v/v) Ethanol extrahiert. Ihre Mengen wurden mittels LC-ESI-MS bestimmt. Der Kontrollstamm TMB118 (Teichmann *et al.*, 2017), dem die Transporter OpuA, OpuB, OpuC und OpuD fehlen, wies Poolgrößen von 18 mM Glycinbetain bzw. 3 mM Arsenobetain auf. Diese Werte spiegeln die unvollständige Entfernung von extrazellulär anhaftenden Soluten im Verlauf der Probenvorbereitung wieder.

Wuchsen die Zellen in Gegenwart von Glycinbetain, wurde dieses unter osmotischem Stress intrazellulär mit einer Konzentration von 495 mM akkumuliert (Abbildung 43). Dies ist sowohl

mit den in Abschnitt 11 dargelegten Daten (Abbildung 8), als auch mit vorhergehenden Messungen mit Hilfe von radioaktiv markiertem Glycinbetain (Hoffmann *et al.*, 2013) sehr gut vereinbar. Wurde der Vorläufer Cholin bereitgestellt, ließ sich dieser in den Zellen in geringen Konzentrationen von 10 mM (SMM) und 4 mM (SMM mit 1,2 M NaCl) nachweisen. Die durch Oxidation von Cholin gebildeten Glycinbetain Pools beliefen sich auf 111 mM (SMM) und 599 mM (SMM mit 1,2 M NaCl) (Abbildung 42). Glycinbetain und Arsenobetain wurden vergleichbaren Konzentrationen akkumuliert. Osmotisch gestresste Zellen, die in Gegenwart von Arsenocholin kultiviert wurden, wiesen überwiegend (77%) Arsenobetain (462 mM) auf. Darüber hinaus wiesen sie einen geringen intrazellulären Arsenocholin Pool von 141 mM auf (Abbildung 43).

Wie bereits in den ^{13}C -NMR Spektren ist auch hier eine geringere Effizienz der Umwandlung von Arsenocholin zu Arsenobetain erkennbar. Ob dieses an einer geringeren Affinität der Enzyme GbsB und GbsA zu ihrem Arsen-haltigen Substraten liegt oder an einer schlechteren Induktion der Genexpression durch Arsenocholin ist hiraus nicht ersichtlich.

18.2 Regulation der *gbsAB* Expression in Antwort auf Arsenocholin und Arsenobetain

Da Arsenocholin den Vorläufer der Arsenobetain Synthese darstellt lässt sich vermuten, dass die Expression der benötigten Enzyme durch Arsenocholin ebenso induzierbar ist, wie durch Cholin (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Eine mögliche GbsR-abhängige Induktion der *gbsA-treA* Expression durch Arsenocholin wurde mit Hilfe der Stämme GNB45 (WT), GNB46 ($\Delta gbsAB$) und GNB48 ($\Delta gbsR$) unter Verwendung einer *gbsA-treA* Reportergenfusion (Nau-Wagner *et al.*, 2012) überprüft. Diese wurden in SMM in An- und Abwesenheit von 1 mM der kompatiblen Solute bis zu einer OD_{578} von 1-1,5 kultiviert. Den Erwartungen entsprechend erfolgte eine Induktion der *gbsA-treA* Expression in Gegenwart von Cholin und Arsenocholin. Die Induktion durch Arsenocholin ($39 \pm 4 \text{ U mg Protein}^{-1}$) erfolgte jedoch auf einem leicht reduzierten Niveau im Vergleich zu der Induktion durch Cholin [$56 \pm 3 \text{ U mg Protein}^{-1}$ (Abbildung 44)]. Dies deutet auf eine geringere Affinität des Regulators GbsR zu Arsenocholin hin, die von Hoffmann *et al.* (2018) mit aufgereinigtem GbsR Protein quantitativ gezeigt werden konnte. Während GbsR Cholin mit einer K_D von $180 \pm 20 \mu\text{M}$ gebunden wurde, erfolgte die Bindung von Arsenocholin mit einer K_D von nur $2,1 \pm 0,2 \text{ mM}$ (Hoffmann *et al.*, 2018). In Abwesenheit des Repressors GbsR (Nau-Wagner *et al.*, 2012) erfolgte die Transkription unter allen getesteten Bedingungen auf einem hohen Level. Eine Antwort auf die Gegenwart des Induktors ist hier nicht mehr gegeben. Expressionslevel auf einem hohen Niveau zeigte auch der *gbsAB* Deletionsstamm (Abbildung 44) da hier der

Induktor nicht mehr durch enzymatische Umwandlung in Glycinbetain bzw. Arsenobetain entfernt wird (Boch *et al.*, 1996; Nau-Wagner *et al.*, 2012).

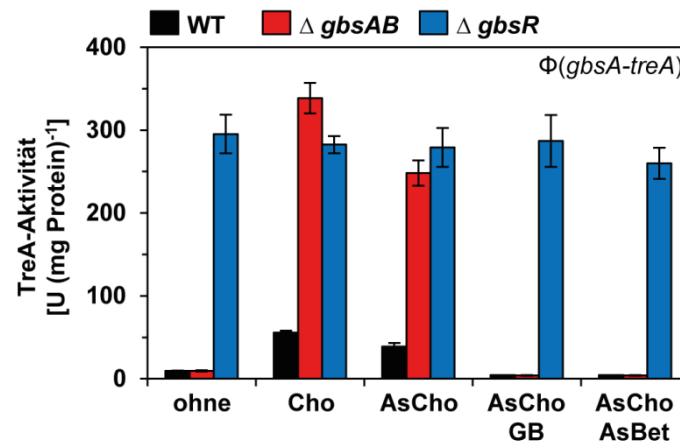


Abbildung 44 GbsR-abhängige Kontrolle der *gbsAB* Expression in Gegenwart von Cholin, Arsenocholin, Glycinbetain und Arsenobetain.

Die *gbsA-treA* Reporterstämme GNB45 (WT), GNB46 ($\Delta gbsAB$) und GNB48 ($\Delta gbsR$) wurden in SMM in Anwesenheit von 1 mM der angegebenen kompatiblen Solute kultiviert. Bei Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} 1-1,5) wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und für die Bestimmung der TreA-Aktivität verwendet.

Hat *B. subtilis* ausreichend Glycinbetain akkumuliert um das osmotische Gleichgewicht einzustellen, führt dies zu einer Verringerung der *gbsAB* Transkription. Dieser Mechanismus ist abhängig von GbsR und lässt sich auch durch die extrazelluläre Bereitstellung von Glycinbetain hervorrufen (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Durch Kultivierung der *gbsA-treA* Reporterstämme in Gegenwart von Arsenobetain, konnte diese negative Rückkopplung auch für Arsenobetain beobachtet werden (Abbildung 44).

VI. Diskussion und Ausblick

Bedingt durch Sonneneinstrahlung und Regenfälle unterliegen Mikroorganismen, wie *B. subtilis*, die die oberen Schichten des Bodens bewohnen dauerhaft Schwankungen in der extrazellulären Osmolarität (Earl *et al.*, 2008; Mundic-Mulec *et al.*, 2015). Eine weit verbreitete Strategie, um in einem solch heterogenen Habitat zu überleben ist die Aufnahme von kompatiblen Soluten um der Plasmolyse unter hyperosmolaren Bedingungen entgegen zu wirken (da Costa *et al.*, 1998; Wood, 2011; Hoffmann und Bremer, 2017; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Glycinebetain stellt dabei das prominenteste Osmolyt dar, welches von allen Domänen des Lebens als Schutz vor osmotischen Stress akkumuliert wird (Yancey, 2005; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Die transkriptionelle Regulation der Aufnahme und Synthese dieses wichtigen kompatiblen Solut wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysiert. Zudem konnte eine neue Sub-Familie der MarR-Typ Regulatoren auf Basis des Repressors der Glycinbetain Synthese (GbsR) aus *B. subtilis* definiert werden.

19 GbsR-Typ Regulatoren – Eine neue Sub-Familie der MarR-Superfamilie

In *B. subtilis* konnten bereits zwei GbsR-Typ Proteine (GbsR und OpcR) identifiziert und in einen funktionellen Zusammenhang mit der osmotischen Stressantwort gebracht werden. Diese kontrollieren die Transkription der Gene für die Synthese von Glycinbetain und solche, die für Transporter für die Aufnahme von kompatiblen Soluten kodieren (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013; Hoffmann and Bremer, 2017). Die ausgedehnte bioinformatische Analyse, die in der vorliegenden Arbeit vorgenommen wurde zeigt, dass GbsR-Typ Proteine sowohl innerhalb der *Archaea* als auch der *Bacteria* weit verbreitet sind (Abbildung 19).

Ihre kodierenden Gene sind häufig mit Genclustern für die Synthese von Glycinbetain oder mit Aufnahmesystemen für kompatible Solute des OpuA-, OpuB- oder OpuC-Typs assoziiert. Darüber hinaus konnten sie jedoch auch innerhalb eines anderen genomischen Kontexts vorgefunden werden. Hierbei handelt es sich zum einen um GbsR Homologe, deren Gene angrenzend an ein *cydAB* oder *cydABCD* Gencluster vorgefunden werden konnten (Abbildung 19), welche für Sauerstoff Reduktasen des Cytochrom-*bd*-Typs kodieren (Borisov *et al.*, 2011; Degli Esposti *et al.*, 2015). Ein solcher Regulator wurde kürzlich von Xia *et al.* (2018) in *Alishewanella* sp. WH16-1 untersucht und als CydE bezeichnet. Dieser agiert als Repressor des angrenzenden *cydAB* Operons (Xia *et al.*, 2018). GbsR-Typ Regulatoren ließen sich auch in Vertretern der *Archaea* finden. Hier konnte jedoch anhand der Gennachbarschaft keine Funktion des Regulators abgeleitet werden (Abbildung 19). Zu dieser heterogenen Gruppe zählt auch das Gen, welches das Protein Mj223 aus *M. jannaschii* kodiert, dessen Kristallstruktur (Ray *et al.*, 2003) als Vorlage für die *in silico* Modelle der Repressoren GbsR [Abbildung 4 (Nau-Wagner *et al.*, 2012)] und OpcR

[Abbildung 37B (Lee *et al.*, 2013)] aus *B. subtilis*, sowie OpuAR aus *B. infantis* [Abbildung 27 (Ronzheimer *et al.*, 2018)] diene. Mj223 kann vermutlich als generelle Vorlage für die Vorhersage der Gesamtstruktur von GbsR-Typ Proteinen herangezogen werden.

Die bisher studierten Regulatoren dieser MarR Sub-Familie agieren alle als Repressoren (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2018; Ronzheimer *et al.*, 2018), dennoch besteht die Möglichkeit dass Vertreter der GbsR-Typ Familie als Aktivatoren fungieren (Grove, 2017; Deochand und Grove, 2017). Für den mit Virulenz und Antibiotikaresistenz assoziierten MarR-Typ Regulator SlyA aus *Salmonella enterica* konnte sogar eine Funktion als Aktivator und Repressor bestimmt werden (Navarre *et al.*, 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Analyse der GbsR-Typ Regulatoren, die mit der osmotischen Stressantwort verknüpft sind anhand der Vertreter GbsR und OpcR aus *B. subtilis*, sowie OpuAR aus *B. infantis*.

19.1 Ligandenbindung durch GbsR-Typ Regulatoren

Die Ligandenbindetaschen von Substratbindeproteinen, wie OpuBC (Pittelkow *et al.*, 2011) und OpuCC (Du *et al.*, 2011) aus *B. subtilis* sowie ChoX aus *S. meliloti* (Oswald *et al.*, 2008), die mit ABC-Transportern für Cholin assoziiert sind, weisen eine gemeinsame Architektur auf. Hierbei bilden vier aromatischen Aminosäuren einen „aromatic cage“ unterschiedlicher Komposition. Diese Erlauben die Ligandenbindung über Kationen- π -Interaktionen, wobei das elektronegative Oberflächenpotential der Aromaten mit der positiv geladene Trimethylammonium Kopfgruppe des Cholins in Wechselwirkung tritt (Dougherty, 1996; Ma und Dougherty, 1997; Mahadevi und Sastry, 2013). Dieser Mechanismus ist nicht ausschließlich der Cholinbindung vorbehalten. Vielmehr handelt es sich um ein generelles Prinzip, dass die Bindung von verschiedenen kompatiblen Soluten mit Stickstoff-, Schwefel-, Arsen-, Selen- oder Tellur-haltigen methylierten Kopfgruppen vermittelt (Schiefner *et al.*, 2004a; Broy *et al.*, 2015; Hoffmann *et al.*, 2018). Eine Ligandenbindestelle mit ähnlicher Struktur konnte auch in dem Glycinbetain Transporter BetP aus *C. glutamicum*, einem Vertreter der BCCT-Typ Transporter identifiziert werden (Ziegler *et al.*, 2010; Perez *et al.*, 2014). In Pflanzen findet die Synthese von Glycinbetain häufig in den Chloroplasten statt (Hanson *et al.*, 1985). Hierfür wird Cholin aus dem Zytosol importiert und zunächst durch eine Cholin Monooxygenase zu Glycinbetain Aldehyd Hydrat umgesetzt (Rathinasabapathi *et al.*, 1997). Dieses befindet sich in wässriger Lösung in einem chemischen Gleichgewicht mit Glycinbetain Aldehyd, welches durch eine NAD-abhängige Glycinbetain Aldehyd Dehydrogenase zu Glycinbetain oxidiert wird (Weretilnyk und Hanson, 1989; Weretilnyk und Hanson, 1990). Durch Kristallstrukturanalysen der Glycinbetain Aldehyd Dehydrogenase aus der Spinatpflanze (*Spinacia oleracea*) konnte gezeigt werden, dass auch dieses Enzym sein Substrat, unter Beteiligung von drei aromatischen Aminosäureresten über Kationen- π -

Interaktion bindet (Zárate-Romero *et al.*, 2016). Eine putative Ligandenbindetasche mit ähnlicher Struktur konnte in allen GbsR-Typ Regulatoren vorgefunden werden, die mit der zellulären Antwort auf osmotischen Stress assoziiert sind (Abbildung 51).

GbsR bindet seinen Liganden Cholin *in vitro* mit einer K_D von 165 μM (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Durch ein Strukturmodell des GbsR Proteins, auf Basis der Kristallstruktur von Mj223 aus *M. jannaschii* (Ray *et al.*, 2003) konnte eine putative Cholinbindetasche identifiziert werden (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Diese wird durch die vier Phenylalaninreste (F^{96} , F^{99} , F^{102} , F^{103}) geformt, die einen „aromatic cage“ bilden könnten (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Der Vergleich von Aminosäuresequenzen der Glycinbetain Synthese assoziierten GbsR-Typ Proteine (Abbildung 50) legte darüber hinaus die Beteiligung von zwei weiteren stark konservierte Phenylalanine (F^{95} und F^{98}), bei der Bildung einer aromatischen Ligandenbindetasche nahe [Abbildung 14D (Ronzheimer, 2015)]. Durch zielgerichtete Mutagenese wurden GbsR Varianten mit Aminosäureaustauschen der betreffenden Phenylalanine generiert. Ihre Fähigkeit zur Bindung von Cholin wurde in einem *in vivo* Ansatz mit Hilfe einer *gbsA-treA* Reportergernefusion getestet. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren F^{95} , F^{96} , F^{98} , F^{102} und F^{103} an der Bindung von Cholin beteiligt sind [Abbildung 15 (Fischer, 2017)]. Auf Basis dieser Analysen ist der Phenylalaninrest an Position 95 als essentiell für die Bindung zu betrachten. Unabhängig von den physikalischen Eigenschaften der eingeführten Aminosäure führte ein Austausch an dieser Position stets zu einem Verlust der Induktion in Gegenwart von Cholin [Abbildung 15 (Fischer, 2017)].

B. subtilis ist in der Lage den zellulären Solut Pool sehr fein an den Grad des osmotischen Stress anzupassen. So erfolgt bei ausreichenden intrazellulären Glycinbetain Konzentrationen eine GbsR-abhängige Inhibition der *gbsAB* Expression um eine Überakkumulation zu verhindern (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Der Zugrundeliegende Mechanismus dieses negativen „Feedback Loops“ ist bisher jedoch nicht geklärt. Denkbar wäre die direkte Bindung von Glycinbetain durch GbsR wobei entweder ein kompetitive Inhibition vorliegen könnte, bei der beide Substrate mit der gleichen Bindetasche interagieren, oder die Existenz einer zweiten Bindestelle für Glycinbetain. Eine direkte Bindung von Glycinbetain durch GbsR konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden. Stattdessen könnte Glycinbetain durch seine Eigenschaft als chemisches Chaperon (Bourot *et al.*, 2000; Ignatova und Gierasch, 2006; Stadtmiller *et al.*, 2017) die Protein-DNA-Interaktion behindern. Alternativ hierzu wäre auch denkbar, dass bei ausreichender Menge an Glycinbetain eine osmotische Induktion der *opuB* und *opuC* Expression nicht mehr gegeben ist. Hierdurch würde es zu keiner weiteren Aufnahme des Induktors Cholin kommen und GbsR könnte wieder an die DNA binden.

Die Definition der Ligandenbindebox in GbsR wird durch Ligandenbindestudien mit dem Verwandten Regulator OpuAR aus *B. infantis* gestützt, der neben Cholin (K_D 193 μM) auch

Glycinbetain (K_D 301 μ M) binden kann (Ronzheimer *et al.*, 2018). OpuAR agiert als Repressor des angrenzenden *opuA* Genclusters (Ronzheimer *et al.*, 2018) und weist eine Sequenzidentität von 34% zu GbsR aus *B. subtilis* auf (Abbildung 51). Auch OpuAR weist eine putative aromatische Ligandenbindetasche auf. Im Gegensatz zu GbsR enthält diese jedoch nur vier aromatische Aminosäurereste. Die Abweichungen betreffen die Positionen 98 und 102 der Sequenz von GbsR. Anstelle von Phenylalaninen liegen hier in OpuAR ein Asparagin und ein Arginin vor (Abbildung 27). Aufbauend auf den Erkenntnissen über GbsR wurde mittels zielgerichteter Mutagenese eine Veränderung in der Zusammensetzung der putativen OpuAR Bindebox vorgenommen so, dass diese ähnlicher zu der Aminosäureabfolge in GbsR wurde. Dabei konnte bei einem simultanen Austausch des Tyrosins an Position 94 (entspricht F⁹⁶ in GbsR) und des Arginins an Position 100 (entspricht F¹⁰² in GbsR) gegen Phenylalaninreste eine deutliche Steigerung der Affinität zu beiden Liganden herbeigeführt werden (Ronzheimer *et al.*, 2018). Die Bindung eines kompatiblen Soluts an einen GbsR-Typ Regulator konnte hiermit erstmals durch rationales Design verbessert werden. Entsprechende Analysen verschiedener Substratbindepoteine zeigte eine Verschlechterung der Affinität zu den jeweiligen Liganden. Dies konnte nicht nur bei einem Austausch von aromatischen Aminosäuren gegen geladene, polare oder neutrale Aminosäurereste beobachtet werden, sondern auch bei dem Austauschen gegen andere aromatische Aminosäuren (Schiefner *et al.*, 2004a; Smits *et al.*, 2008; Tschapek *et al.*, 2011; Pittelkow *et al.*, 2011).

Obwohl auch OpcR aus *B. subtilis* eine entsprechende putative Ligandenbindetasche aufweist, ist ein möglicher Ligand bisher unbekannt (Lee *et al.*, 2013). Generell sind bei einem Vergleich der GbsR-Typ Proteine, die mit osmotischen Stress assoziiert sind, Unterschiede in der Zusammensetzung der potentiellen Ligandenbindestellen zu finden (Abbildung 51). Diejenigen, die in Verbindung mit der Biosynthese von Glycinbetain stehen (GbsR) weisen Bindetaschen mit sechs aromatischen Aminosäuren auf, bei denen es sich mit wenigen Ausnahmen immer um Phenylalanine handelt. Dagegen weisen GbsR-Typ Proteine die mit Aufnahmesystemen für kompatible Solute assoziiert sind (OpuAR, OpCR und YvaV) überwiegend Bindeboxen aus vier aromatischen Aminosäureresten auf. Die Abweichungen sind hierbei stets an den Positionen 98 und 102 relativ zu GbsR aus *B. subtilis* vorzufinden. Dies könnte Ursache für die unterschiedliche Ligandenspezifität sein.

In den Aminosäuresequenzen der GbsR Homologe, deren Gene die mit *cydAB* Genclustern oder Genen unbekannter Funktion vorliegen, ist eine solche Clusterung von Aromaten nicht vorhanden (Abbildung 52). Dies deutet auf unterschiedliche Effektoren hin. Auf Grund der Architektur der putativen Bindetasche in GbsR-Typ Regulatoren, die mit osmotischem Stress assoziiert sind, ist die Bindung von kompatiblen Soluten oder ähnlichen Substanzen mit einer Trimethylammonium oder Dimethylsulfonium Kopfgruppe als Liganden

wahrscheinlich. Die Effektoren von MarR-Typ Regulatoren sind jedoch divers. So konnte für den Repressor CydE aus *Alishewanella* sp. WH16-1, der keine Bindebox aus aromatischen Aminosäuren aufweist, gezeigt werden, dass dieser Sulfat als Induktor nutzt (Xia *et al.*, 2018). Stoffwechselwege aromatischer Verbindungen, die durch Regulatoren der MarR-Familie kontrolliert werden, nutzen diese Substrate vielfach als Induktoren (Providenti und Wyndham, 2001; Yoshida *et al.*, 2007; Davis und Sello, 2010; Perera und Grove, 2010; Grove, 2017). In Systemen die auf Oxidativen Stress reagieren, wird dieser Reiz häufig über die Modifikation von Cysteinresten innerhalb der involvierten MarR-Typ Regulatoren detektiert (Fuangthong *et al.*, 2001; Sukchawalit *et al.*, 2001; Panmanee *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006; Perera und Grove, 2010; Grove, 2017).

Eine Hürde für das Verständniss der Ligandenbindung durch GbsR-Typ Regulatoren, die mit osmotischem Stress assoziiert sind ist dadurch gegeben, dass ihre Ligandenbindestellen bisher nicht im Rahmen von Strukturanalysen studiert wurden. Die Bestimmung der beteiligten Aminosäurereste erfolgte stets durch indirekte Experimente (Fischer, 2017; Ronzheimer *et al.*, 2018). Die hierfür zugrunde gelegten *in silico* Modelle können die räumliche Ausrichtung der Aminosäuren in der putativen Ligandenbindestelle, auf Grund der geschilderten Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung innerhalb dieser Region nicht zuverlässig vorhersagen. Um einen endgültigen Beweis für die Determinanten der Ligandenbindung zu erbringen, ist eine Kristallstrukturanalyse unabdingbar.

Besonders aussichtsreich erscheint hierbei das homodimere Protein OpuAR aus *Paenibacillus lautus* (Abbildung 54). Dieses Bakterium wurde aus einer heißen Quelle des Yellowstone Nationalparks isoliert, sein Ursprung ist vermutlich der Intestinaltrakt von Bisons (Mead *et al.*, 2012). Das Gen dieses Regulators grenzt an ein Gencluster für einen OpuA-Typ Transporter an und ist der einzige GbsR-Typ Regulator in *P. lautus* (Abbildung 19). Dieser Regulator weist eine Sequenzidentität von 38% zu GbsR aus *B. subtilis* auf und verfügt ebenfalls über eine putative Ligandenbindebox aus sechs aromatischen Aminosäureresten. Hierbei handelt es sich nicht ausschließlich um Phenylalaninreste, stattdessen liegen an den Positionen 100 (entspricht F⁹⁵ in GbsR) und 101 (entspricht F⁹⁶ in GbsR) ein Tryptophan- bzw. ein Tyrosinrest vor (Abbildung 52 und Abbildung 54). Mögliche Liganden des OpuAR Proteins, sowie seine physiologische Funktion wurden bisher jedoch nicht analysiert.

Erste Versuche der Kristallisation (Abbildung 45A) in Kooperation mit Nils Mais und Gert Bange (Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg, DE) lieferten kristallographische Daten mit einer Auflösung von 2,3 – 2,4 Å (Nils Mais und Gert Bange, persönliche Mitteilung). Die Struktur konnte jedoch bisher auf Grund von mangelnden Phaseninformationen nicht gelöst werden. Aus diesem Grund sollte als nächster Schritt ein Selenomethioninaustausch vorgenommen werden. Bei der heterologe Produktion des

Proteins werden hierbei die Methionine des Proteins durch Selenomethionin ausgetauscht. Dieses enthält anstelle von Schwefelatomen Selen, was zu einer Erhöhung der Elektronenanzahl führt. Die Erhebung von Phaseninformationen wird durch die hieraus resultierende Veränderung in der Beugung der Röntgenstrahlen erleichtert (Pike *et al.*, 2016). Kristalle wurden ebenfalls für die Proteine GbsR und OpcR aus *B. subtilis*, sowie für OpuAR aus *B. infantis* erhalten (Abbildung 45BCD). Diese lieferten jedoch auf Grund von mangelnder Streuung keine verwertbaren Daten.

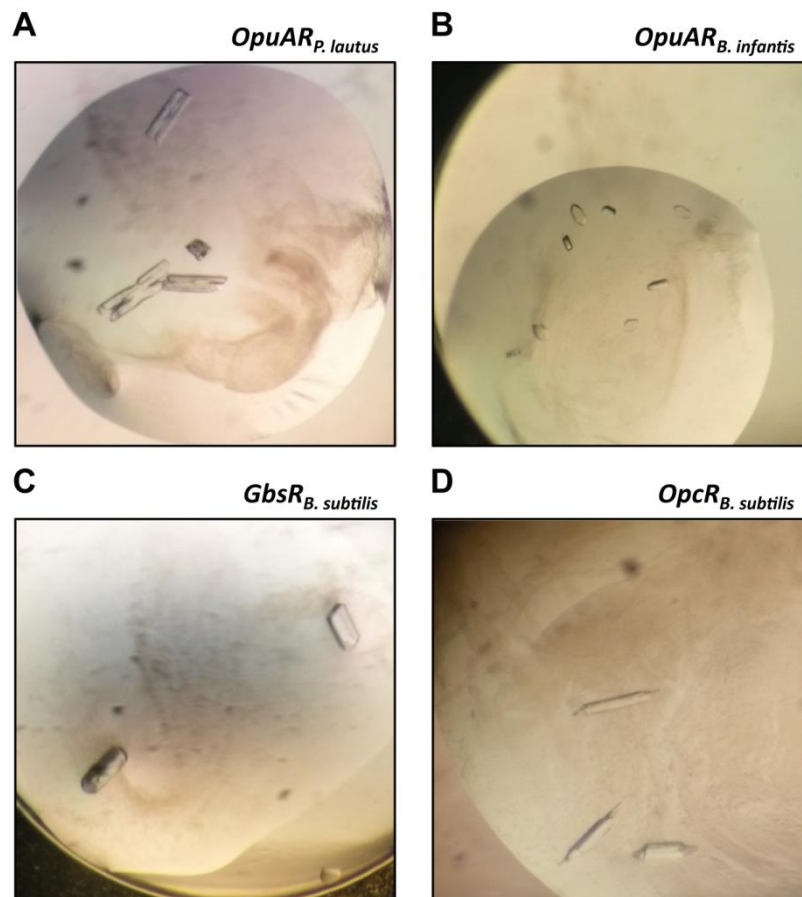


Abbildung 45 Kristalle der GbsR-Typ Proteine GbsR, OpuAR und OpcR.

Gezeigt sind Proteinkristalle von (A) OpuAR aus *P. lautus* (pSTH03), (B) OpuAR aus *B. infantis* (pMP_AR1), sowie (C) GbsR (pSTH02) und (D) OpcR (pSTH14) aus *B. subtilis*. Unmittelbar nach erfolgter Reinigung mittels Strep-Tag Affinitätschromatographie (100 mM KPP (pH 8), 300 mM NaCl) und Größenausschlusschromatographie (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg) erfolgte die Kristallisation. Dies erfolgte für OpuAR aus *P. lautus* in einer Lösung aus 0,2 M KH_2PO_4 und 20% PEG 3350, für OpuAR aus *B. infantis* in einer Lösung aus 0,1 M NH_4Cl und 20% PEG 3350, für GbsR in einer Lösung aus 18 mM CaCl_2 , 90 mM Na-Acetat (pH 4,6), 27% MPD und 10% Glycerin und für OpcR in einer Lösung aus 0,2 M CaCl_2 und 20% PEG 3350. Kristalle zeigten sich nach einem Zeitraum von 24 Stunden.

19.2 DNA-Bindung durch GbsR-Typ Regulatoren

Alle bisher genauer studierten GbsR-Typ Regulatoren (GbsR, OpcR, OpuAR und CydE) agieren als Repressoren (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2018; Ronzheimer *et al.*, 2018). Die Art und Weise, in der Repressoren ihren negativen Effekt auf

die Transkription ausüben ist vielfältig. Zu den Mechanismen zählen die sterische Behinderung der RNA-Polymerase in ihrer Promotorbindung oder während der Elongation, lokale Strukturveränderungen der DNA oder eine anti-Aktivierung (Bervoets und Charlier, 2019). Die DNA-Bindemotive von MarR-Typ Regulatoren überlappen häufig mit den Promotorelementen und blockieren so den Zugang der RNA-Polymerase (Perera und Grove, 2010). Hierbei handelt es sich typischerweise um 16 bis 20 bp lange palindromische DNA-Regionen die „inverted repeats“ enthalten (Martin und Rosner, 1995; Martin *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 2001; Wilkinson und Grove, 2004; Perera und Grove, 2010). Die Erkennungshelix des wHTH Motivs der Regulatoren bindet dabei an die große DNA-Furche, während der „wing“ mit der benachbarten kleinen Furche Interagiert (Aleksun *et al.*, 2002; Kumarevel *et al.*, 2009; Perera und Grove, 2010; Gupta *et al.*, 2019). Die DNA-Bindung erfolgt entweder als Homodimer oder als Komplex aus Dimeren, die mit angrenzenden Bindestellen interagieren (Wilkinson und Grove, 2004; Hommais *et al.*, 2008; Perera und Grove, 2010). Dabei besteht ein Zusammenhang zwischen dem Abstand der beiden „repeats“ und dem zwischen den DNA-Bindedomänen der homodimeren Regulatoren (Perera und Grove, 2010).

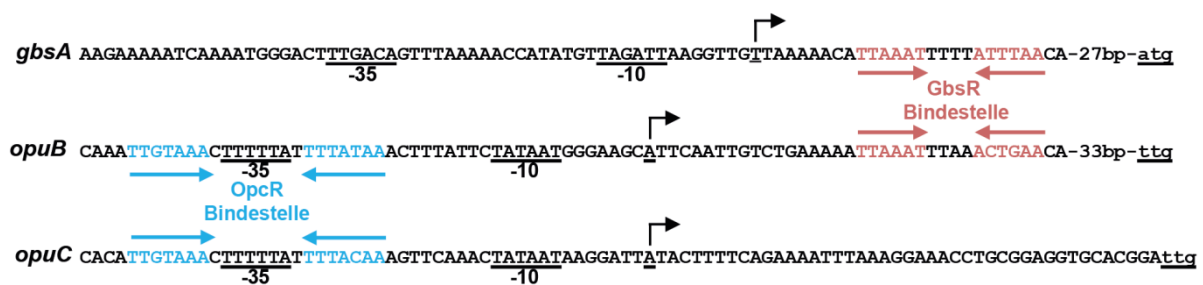


Abbildung 46 DNA-Bindestellen der GbsR-Typ Repressoren GbsR und OpcR.

Sequenzvergleich der *gbsAB*, *opuB* und *opuC* Promotorregion. Eingezeichnet sind die DNA-Bindestellen der Repressoren GbsR [rot (Ronzheimer, 2015; vorliegende Arbeit)] und OpcR [blau (Lee *et al.*, 2013)]. Der Transkriptionsstart ist durch gebogene Pfeile dargestellt und die -35 und -10 Region der SigA Promotoren sind hervorgehoben. Die Promotoren des *gbsAB* und des *opuB* Operons wurden experimentell bestimmt (Kappes *et al.*, 1999; Nau-Wagner *et al.*, 2012). Der Promotor des *opuC* Operons wurde hiervon abgeleitet (Nau-Wagner *et al.*, 2012).

In *B. subtilis* kontrollieren die beiden MarR-Typ Repressoren GbsR und OpcR die Aufnahme und Synthese von kompatiblen Soluten (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013). GbsR und OpcR weisen dabei zwei separate DNA-Bindestellen auf (Abbildung 46). Die Bindung von GbsR an die Promotorregionen des *gbsAB* und *opuB* Operons erfolgt stromabwärts des Transkriptionsstarts [Abbildung 46 (Ronzheimer, 2015)]. GbsR agiert somit durch einen „road-block“ Mechanismus, welcher die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor erlaubt. Das Fortschreiten des Enzyms wird jedoch sterisch behindert (Bervoets und Charlier, 2019). Das GbsR-Bindemotiv ist innerhalb der Gattung *Bacillus* hochgradig

konserviert (Abbildung 10 und Abbildung 13), was vermuten lässt, dass alle diese Vertreter auf die Gleiche Weise agieren, wie GbsR aus *B. subtilis*.

Wie bei den meisten MarR-Typ Regulatoren überlappt das DNA-Bindemotiv des OpcR Repressors mit der -35 Region der SigA-Promotoren des *opuB* und *opuC* Operons (Kappes *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2013). Bei den Operatorsequenzen von GbsR und OpcR handelt es sich um AT-reiche „inverted repeats“, die sich jedoch in der Länge ihrer „spacer“ unterscheiden. Die Bindung der GbsR-Typ Regulatoren an ihre Operatorsequenz erfolgt hoch-spezifisch. So findet in *B. subtilis* keine Interaktion der GbsR-verwandten Regulatoren OpcR und YvaV mit der *gbsAB* Promotorregion statt (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Die Spezifität der Interaktion von GbsR-Typ Regulatoren mit ihren DNA-Bindestellen wird auch durch die Studien zu dem regulatorischen *opuA-opuAR*-System aus *B. infantis* deutlich. Die OpuAR-vermittelte Regulation des *opuA* Genclusters aus *B. infantis* wurden durch heterologe Studien in *B. subtilis* analysiert. Hierbei konnten die nativen GbsR-Typ Regulatoren aus *B. subtilis*, keine reprimierende Funktion im Bezug auf die *opuA* Expression ausüben (Ronzheimer *et al.*, 2018). Eine Ursache für diese Spezifität könnten die unterschiedlichen Spacerlänge der DNA-Bindestellen sein. Für GbsR konnte bereits gezeigt werden, dass die Spacerlänge kritisch für die DNA-Bindung ist [Tabelle 10 (Ronzheimer, 2015)]. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von GbsR- und OpcR-Typ Regulatoren zeigte eine Reihe konservierter Aminosäurereste innerhalb der DNA-Bindedomäne, jedoch auch Gruppenspezifische Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung (Abbildung 50). Hierin könnte ein weiterer Grund für die selektive DNA-Erkennung liegen. Dass eine spezifische Interaktion zwischen Aminosäuren des wHTH und den Basen des DNA-Bindemotivs vorliegen, konnte bereits für den MarR-Typ Regulator MepR aus *S. aureus* gezeigt werden (Birukou *et al.*, 2014).

Interessanterweise ist die Kristallisierte Form des GbsR-Typ Proteins Mj223 nicht mit der Bindung einer standard B-Form DNA vereinbar (Ray *et al.*, 2003). Ein Modell der DNA-gebundenen Struktur des Regulators legt nahe, dass dieser Vorgang eine starke Konformationsänderung voraussetzt (Ray *et al.*, 2003). Ähnliches konnte auch für MexR aus *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt werden, der als Repressor des Antibiotika Efflux Gencluster *mexAB-oprM* agiert. Strukturanalysen zeigten Unterschiede in der Konformation der kristallisierten Monomere. Diese wiesen Abstände zwischen den DNA-Bindedomänen von 22,6 bis 29,2 Å auf. Letzteres ist mit der Bindung der Operatorsequenz vereinbar, während geringere Abstände in der offenen Konformation vorzufinden sind (Lim *et al.*, 2002). Diese Konformationsänderungen werden durch eine flexible Linkerregion ermöglicht, die zwischen der DNA-Bindedomäne und der Dimerisierungsdomäne lokalisiert ist (Ray *et al.*, 2003). Für GbsR lässt sich hieraus ableiten, dass durch die Bindung des Liganden Cholin möglicherweise eine Konformationsänderung induziert wird, durch die der Repressor nicht

mehr in der Lage ist an die DNA zu binden. Dass der Linker in der Funktion von GbsR eine kritische Rolle einnimmt konnte durch einen Suppressor-Screen gezeigt werden, der zu erhöhten Mengen eines ineffizienten hybriden OpuB::OpuCC Transporters führte. Suppressoren, die einen Wachstumsvorteil auf hochosmolaren Medium mit limitierenden Glycinbetain Konzentrationen zeigten, trugen Mutationen in *gbsR*. Hierbei wurden diverse Mutationen identifiziert, die zu einem Aminosäureaustausch in der Linkerregion führen. Die resultierenden Proteine zeigten entweder eine verschlechterte DNA-Bindung oder sogar einen kompletten Verlust dieser Funktion (Teichmann *et al.*, 2017; Teichmann, 2018). Denkbar wäre hiernach, dass die Aminosäureaustausche den Regulator in einer DNA-inkompatiblen Konformation halten oder diese zumindest begünstigen. Die korrekte Faltung und Dimerisierung wurde am Beispiel von GbsR⁸³G/D mittels Größenausschlusschromatographie (Abbildung 55) überprüft. Diese Mutation führt zu einem vollständigen Verlust der DNA-Bindung durch GbsR (Teichmann, 2018). Ein Umgekehrtes Ergebnis konnte im Rahmen eines Screens erzielt werden, bei dem *B. subtilis* Stämme analysiert wurden, die eine Resistenz gegen ein toxisches Glycinbetain Derivat zeigten. Ein Aminosäureaustausch in der Linkerregion des OpcR Repressors (Lee *et al.*, 2013) führte zu einem Verlust der *opuC* Expression (Anita Dornes und Erhard Bremer, persönliche Mitteilung). Hierbei führt eine Veränderung der Linkersequenz vermutlich dazu, dass der Regulator nicht mehr von der DNA gelöst werden kann. Zusammengefasst ermöglicht die Linkerregion die dynamische DNA-Bindung des GbsR Repressors.

Eine genaue Auskunft über die Determinanten der Interaktion zwischen GbsR bzw. OpcR und den jeweiligen DNA-Bindestellen könnte durch eine Kristallisation der Regulatoren in Gegenwart von DNA erlangt werden. Ergänzend könnte eine Mutagenesestudie durchgeführt werden, im deren Rahmen die mit DNA interagierenden Aminosäuren in GbsR und OpcR gegeneinander ausgetauscht werden könnten. Zu erwarten wäre hierbei, dass nun die jeweils andere Erkennungssequenz gebunden wird.

20 Das Zusammenspiel zweier GbsR-Typ Regulatoren und eines Aktivators reguliert die Aufnahme und Synthese von kompatiblen Soluten in *B. subtilis*

In *B. subtilis* sind zwei GbsR-Typ Regulatoren an der Kontrolle der Aufnahme und Synthese von kompatiblen Soluten beteiligt. Die Expression der Glycinbetain Synthesegene *gbsAB* steht dabei alleine unter der Kontrolle des Repressors GbsR. Dieser erlaubt die Detektion von Cholin, Glycinbetain Aldehyd sowie Arsenocholin und stellt sicher, dass die Produktion der entsprechenden Enzyme nur in Anwesenheit ihrer Substrate erfolgt (Boch *et al.*, 1996; Boch *et al.*, 1997; Nau-Wagner *et al.*, 2012). Ebefalls durch GbsR reguliert ist die Transkription des Cholin-spezifischen Transporters OpuB, was die effiziente Bereitstellung

des Vorläufers Cholin für die Synthese von Glycinbetain gewährleistet (Boch *et al.*, 1996; Kappes *et al.*, 1999; Nau-Wagner *et al.*, 2012). An der Regulation der *opuB* Expression ist zusätzlich ein weiterer GbsR-Typ Repressor, OpcR (Lee *et al.*, 2013) beteiligt (Abbildung 32). Unter Kontrolle dieses Repressors steht auch die Transkription des *opuC* Operons [Abbildung 33 (Lee *et al.*, 2013)]. Die Gene für den OpuC Transporter, der neben der Aufnahme von Cholin auch den Import einer Vielzahl anderer kompatibler Solute vermittelt steht jedoch nicht unter der Kontrolle des Cholin-sensitiven Proteins GbsR (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Hoffmann und Bremer, 2017). Auf Grund des breiten Substratspektrums des ABC-Transporters ist dies physiologisch sinnvoll.

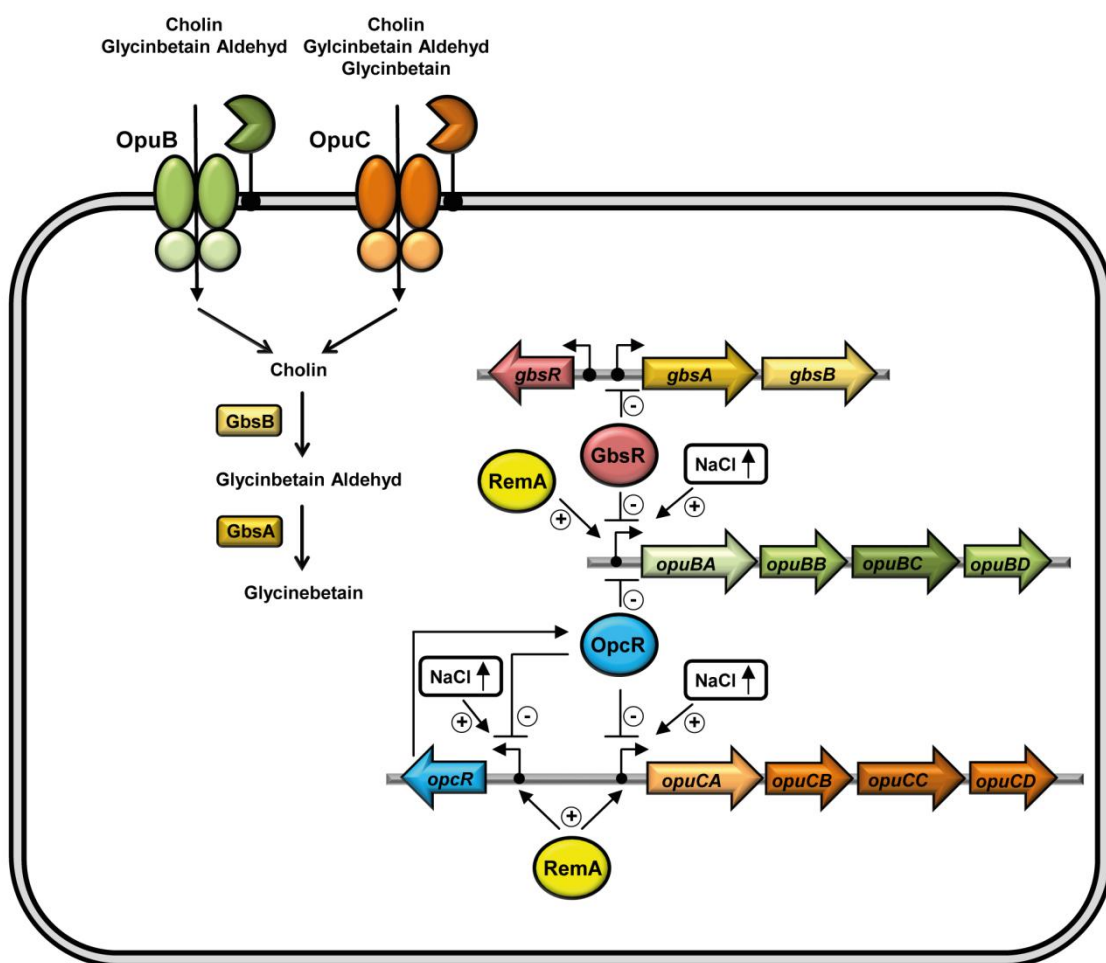


Abbildung 47 Das Zusammenspiel von zwei GbsR-Typ Repressoren und einem Aktivator Reguliert die Aufnahme und Synthese von kompatiblen Soluten in *B. subtilis*.

Schematische Darstellung der Regulation des *gbsAB*, *opuB* und *opuC* Operons, sowie des *opcR* Gens. Aktivierende Faktoren sind durch Pfeile mit einem + dargestellt, während Reprimierende Faktoren durch Balken mit einem – gekennzeichnet sind (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Winkelmann *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2013; vorliegende Arbeit)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte darüber hinaus eine Aktivierung der *opuB*, *opuC* und *opcR* Expression durch den Biofilm Aktivator RemA (Winkelmann *et al.*, 2009; Winkelmann

et al., 2013) bestätigt werden. Der aktuelle Stand der Erkenntnisse über dieses komplexe Regulationsnetzwerk ist schematisch in Abbildung 47 dargestellt. Hierbei können drei wesentliche Komponenten ausgemacht werden, die an der Steuerung der Expression beteiligt sind:

- (I) Die Osmolarität der Umgebung, die auf die Zelle einwirkt
- (II) Die Repression durch die GbsR-Typ Regulatoren GbsR und OpcR
- (III) Die Aktivierung durch RemA.

20.1 Transkriptionelle Kontrolle der ABC-Transporter OpuB und OpuC

B. subtilis ist in der Lage eine Vielzahl von vorgeformten kompatiblen Soluten aus der Umgebung als Schutz von osmotischen Stress zu nutzen (Hoffmann und Bremer, 2016; Hoffmann und Bremer, 2017). Da diese üblicherweise nur in geringen Konzentrationen vorliegen, sind hochaffine Aufnahmesysteme nötig (Welsh, 2000; Warren, 2016; Bouskill *et al.*, 2016; Webb *et al.*, 2017). *B. subtilis* weist fünf solcher Transportsysteme für kompatible Solute auf (Hoffmann und Bremer, 2016; Hoffmann und Bremer, 2017). Die beiden ABC-Transporter OpuB und OpuC stellen hierbei eine Besonderheit dar, da sie vermutlich aus einer Genduplikation entstanden sind. Ihre einzelnen Komponenten weisen eine starke Aminosäuresequenzidentität zwischen 85% (Permeasen OpuBB/OpuCB und OpuBD/OpuCD) und 69% (SBPs OpuBC und OpuCC) auf (Kappes *et al.*, 1999) und bioinformatische Analysen ihres Vorkommens in Stämmen der Gattung *Bacillus* legen nahe, dass der OpuB Transporter aus dem OpuC System hervorgegangen ist (Teichmann *et al.*, 2018). Ungeachtet ihres hohen Verwandtschaftsgrades weisen die beiden Transporter Substratspektren auf, die sich drastisch unterscheiden.

Neben ihrem Substratspektrum unterscheiden sich die nahe verwandten Transportsysteme OpuB und OpuC auch in ihrer transkriptionellen Antwort auf extrazelluläre Salinitäten (Abbildung 29). Dabei zeigt das *opuB* Operon eine Steigerung der Transkriptionslevel in Abhängigkeit von der umgebenden Osmolarität, wie sie bereits für die Expression des *opuA* Operons aus *B. subtilis* beschrieben ist (Hoffmann *et al.*, 2013). Unter hochosmotischen Bedingungen erreichen die Expressionslevel beider Gencluster ein Maximum, dass durch weiter ansteigende Salinitäten nicht mehr gesteigert werden kann [Abbildung 29 (Hoffmann *et al.*, 2013)]. Hiervon abweichend konnten zwei weitere Expressionsmuster in Antwort auf unterschiedliche Salinitäten in *B. subtilis* gezeigt werden. Das Expressionsniveau des *proHJ* Operons, das für die Enzyme der osmoadaptiven Synthese von Prolin kodiert, ist linear abhängig von der extrazellulären Salinität (Brill *et al.*, 2011a). Eine weiterführende Mutagenesestudie des *proHJ* Promotors zeigte, dass hierfür der nicht-optimale 16 bp Spacer des SigA Promotors wichtig ist (Hoffmann *et al.*, 2017). Ein identisches Transkriptionsmuster

konnte auch für die osmotische Induktion des *opuE* Gens für den Prolin-spezifischen Transporter OpuE (von Blohn *et al.*, 1997), sowie das Autolysin Gen *yocH* (Seibert, 2008) gezeigt werden. Anders verhält es sich für das *yqiHIK* Operon, dessen Gene für Zellwand modifizierende Enzyme kodieren. Ein Basallevel der Expression wird hier unter moderaten Salinitäten nicht überschritten. Erst starker osmotischer Stress führt zu einer Konzentrationsabhängigen Steigerung der Promotoraktivität (Fischer und Bremer, 2012). *yqiHIK* steht unter der Kontrolle des Zwei-Komponenten-Systems DegS-DegU, wobei die intrazellulären DegU~P Level das Expressionsmuster bestimmen (Fischer, 2012; Löbach, 2015). Die Analyse der Expression des *opuC* Operons unter steigenden NaCl-Konzentrationen zeigte ein Transkriptionsmuster, das bisher noch für kein salzinduziertes Gen in *B. subtilis* beschrieben wurde. Die Transkription des Genclusters wird in Gegenwart geringer Salinitäten verstärkt und erreicht bei einer NaCl-Konzentration von 0,4 M ein Maximum. Weiter ansteigende Osmolaritäten führen zu einer Reduktion der *opuC* Expression (Abbildung 29). Die physiologische Ursache für dieses Expressionsmuster ist bislang unklar.

20.2 OpcR – Hochsalzrepressor der *opuC* Expression

In *B. subtilis* grenzen Gene für GbsR-Typ Regulatoren sowohl an das *opuB* (*yvaV*), als auch an das *opuC* (*opcR*) Operon an [Abbildung 19 (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013)]. Während die Funktion von YvaV auch nach Abschluss der vorliegenden Arbeit unklar bleibt, wurde OpcR bereits 2013 von Lee *et al.* als Repressor der *opuB* und *opuC* Expression beschrieben. Hierbei konnte ein Einfluss von OpcR auf die Transkription des *opuB* Operons jedoch nur in Abwesenheit von GbsR gezeigt werden (Lee *et al.*, 2013). Die Funktion von OpcR als Repressor konnte bestätigt werden, jedoch zeigte sich auch in Gegenwart des Repressors GbsR ein deutlicher Einfluss von OpcR auf die *opuB* Expressionslevel (Abbildung 32). Dies lässt sich durch die von Lee *et al.* gewählten Versuchsbedingungen zurückführen, bei der *B. subtilis* in Medium mit 0,5 M NaCl kultiviert wurde (Lee *et al.*, 2013). Unter diesen Bedingungen besteht jedoch kein signifikanter Einfluss des OpcR Repressors. Erst unter starkem osmotischen Stress wird dies deutlich (Abbildung 56). Regulatorische Proteine der MarR-Superfamilie, deren Sub-Familie die GbsR-Typ Regulatoren darstellen, kontrollieren typischerweise die Transkription ihrer angrenzenden Gene. Sie können jedoch auch auf weiter entfernte Gene wirken (Gupta *et al.*, 2019). Ein solches Beispiel ist der Regulator GbsR aus *B. subtilis*, der die Expression der angrenzenden Gene für die Synthese von Glycinbetain aber auch die des *opuB* Operons reprimiert (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Ein extremes Beispiel stellt SlyA aus *E. coli* dar, dessen Regulon 30 Gencluster umfasst. Hierbei nimmt der Regulator sowohl reprimierende als auch aktivierende Funktionen ein (Curran *et al.*, 2017).

OpcR konnte als Determinante für das zuvor geschilderte Expressionsmuster von *opuC* bei steigenden Salinitäten bestimmt werden. In Abwesenheit von OpcR kommt es zu einer Veränderung des Transkriptionsmusters so, dass die Expressionslevel kontinuierlich in Abhängigkeit von der Salinität des Mediums ansteigen (Abbildung 34). OpcR ist somit für die Reetablierung der *opuC* Expression in Gegenwart von Salzstress verantwortlich. Diese Funktion wird durch die NaCl-abhängige Expression des *opcR* Gens ermöglicht (Abbildung 35A). Ähnliches konnte bereits für CosR aus *Vibrio cholerae* gezeigt werden (Shikuma *et al.*, 2013). Dieser MarR-Typ Regulator agiert als Repressor des angrenzenden *opuD* Gens und der Ectoin Biosynthese Gene (*ectABC-ask*). Sowohl die Expression des *ectABC-ask* Genclusters als auch die des *cosR* Gens wird durch erhöhte NaCl-Konzentrationen gesteigert. Für *cosR* konnte jedoch gezeigt werden, dass die Transkription nicht durch hohe Osmolaritäten, sondern durch die Ionenstärke kontrolliert wird (Shikuma *et al.*, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass dies für Induktion der *opcR* Expression in *B. subtilis* nicht zutreffend ist. Hier handelt es sich um eine Expression in Antwort auf einen allgemeinen osmotischen Stimulus (Abbildung 35B).

Mehr als die Hälfte der charakterisierten MarR-Typ Regulatoren zeigen eine auto-regulatorische Funktion (Wilkinson und Grove, 2006). Dies ist auch für OpcR der Fall. Unter hochosmolaren Bedingungen Reprimiert OpcR seine eigene Expression (Abbildung 36). Eine putative DNA-Bindestelle, wie sie von Lee *et al.* (2013) für das *opuB* und *opuC* Operon vorgeschlagen wurde konnte innerhalb der vermuteten *opcR* Promotorregion jedoch nicht identifiziert werden. Um zu klären, ob auch hier eine direkte Bindung des Regulators vorliegt könnten EMSA, sowie Footprint Analysen durchgeführt werden.

21 Die Synthese des Osmolyts Arsenobetain in *B. subtilis*

Im Gegensatz zu einer Vielzahl an Arsen-haltigen Substanzen ist die, in marinen Ökosystemen weit verbreitete, organische Arsenverbindung Arsenobetain nicht toxisch (Kaise *et al.*, 1985; Molin *et al.*, 2015). Die chemisch ähnliche Struktur zu Glycinbetain führte zu der Annahme einer osmoprotektiven Funktion von Arsenobetain in *Prokarya* und *Eukarya* (Popowich *et al.*, 2016). Die Bestätigung dieser Vermutung gelang Hoffmann *et al.* (2018) mit Hilfe des Gram-positiven Modelorganismus *B. subtilis*. Darüber hinaus zeigte Arsenobetain auch eine Protektive Wirkung unter Temperaturen, die das oberen und unteren Wachstumslimit von *B. subtilis* darstellen (Hoffmann *et al.*, 2018). Osmotisch gestresste Zellen akkumulieren Arsenobetain in unmodifizierter Form und weisen eine mit Glycinbetain vergleichbare Poolgröße dieser Arsenverbindung auf (Abbildung 42 und Abbildung 43). Ein intrazellulärer Arsenobetain Pool konnte auch in Mikroorganismen aus dem stark Arsen-haltigen (Edwardson und Hollibaugh, 2017) hypersalinen Mono Lake in Kalifornien (USA) detektiert werden (Ciulla *et al.*, 1997). Salzwasserkrebse stellen hier möglicherweise den

Ursprung des Arsenobetains dar. Sie ernähren sich von Algen, die Produzenten von Arsenhaltigen Zuckerverbindungen sind, welche durch die Krebse zu Arsenobetain umgesetzt werden könnten (Ciulla *et al.*, 1997).

Ebenso wie durch Arsenobetain konnte eine *gbsAB*-abhängige Protektion von *B. subtilis* durch Arsenocholin demonstriert werden, was eine Oxidation zu Arsenobetain nahelegt (Hoffmann *et al.*, 2018). Die Synthese von Arsenobetain aus Arsenocholin konnte bestätigt werden (Abbildung 42 und Abbildung 43). Dabei erlaubt die Synthese die Etablierung der gleichen intrazellulären Poolgrößen wie durch die Aufnahme von Glycinbetain (Abbildung 43). Dieser Vorgang basiert auf den gleichen biosynthetischen Enzymen wie die Synthese des Stickstoff-haltigen Glycinbetains (Boch *et al.*, 1994; Boch *et al.*, 1996; Hoffmann *et al.*, 2018). Ebenso wie der Glycinbetain Vorläufer Cholin (Nau-Wagner *et al.*, 2012), dient auch Arsenocholin als Induktor des *gbsAB* Operons (Abbildung 44). Beide Verbindungen werden dabei durch den Repressor GbsR gebunden. Jedoch ist die Affinität für die Trimethylarsenverbindung deutlich geringer (Hoffmann *et al.*, 2018). In *B. subtilis* wird somit die Synthese von Arsenobetain aus Arsenocholin durch die gleiche regulatorische und biosynthetische Maschinerie vermittelt, die auch der Synthese von Glycinbetain zu Grunde liegt. Daher kann angenommen werden, dass jeder mikrobielle Cholin zu Glycinbetain Syntheseweg auch zu der Synthese von Arsenobetain aus dem entsprechenden Vorläufer in der Lage sein sollte.

Dieser Befund könnte von medizinischer Relevanz für den Menschen sein. Durch den Verzehr von Meeresfrüchten gelangt Arsenobetain auch in den menschlichen Organismus (Molin *et al.*, 2015; Thomas und Bradham, 2016). Obwohl es zur Ausscheidung von Arsenobetain über den Urin kommt (Molin *et al.*, 2015; Thomas und Bradham, 2016; Taylor *et al.*, 2017), sollten die Organismen der Darmflora, durch eine weite Verbreitung der Importer für Cholin und Glycinbetain auch zu der Aufnahme der Arsen-haltigen Gegenstücke in der Lage sein (Lucht und Bremer, 1994; Wood *et al.*, 2001; Ziegler *et al.*, 2010; Wood, 2011). Es besteht die Möglichkeit, dass das aufgenommene Arsenobetain von ihnen zu verschiedenen methylierten Arsenverbindungen metabolisiert wird (Devesa *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2007), wodurch auch toxische Metabolite entstehen könnten.

22 OpuA aus *B. infantis* – Ein substratinduzierter Transporter für kompatible Solute

Das marine Bakterium *B. infantis* wurde aus dem Golf von Mexiko isoliert (Siefert *et al.*, 2000). Zur Protektion unter hochosmolaren Bedingungen nutzt *B. infantis* Glycinbetain, Prolinbetain, Homobetain, DMG und DMSP als kompatible Solute (Ronzheimer *et al.*, 2018). Bioinformatische Analysen zeigten OpuA-, OpuD-, OpuE-, und OpuF-Typ Transporter als mögliche Aufnahmesysteme (Abbildung 7). Eine funktionelle Charakterisierung erfolgte bereits für den OpuF und den OpuA Transporter (Teichmann *et al.*, 2018; Ronzheimer *et al.*,

2018). Dabei zeigten die beiden ABC-Transporter ein stark überlappendes Substratspektrum. Während OpuF die Aufnahme von Glycinbetain, Prolinbetain, Homobetain und DMG vermittelt (Teichmann *et al.*, 2018), fungiert OpuA zusätzlich auch als Importer für DMSP. OpuA ist somit in der Lage jedes der von *B. infantis* genutzten Osmolyte in die Zelle zu schleusen (Ronzheimer *et al.*, 2018). Obwohl bezüglich des Substratspektrums und des strukturellen Aufbaus eine große Ähnlichkeit des OpuA Transporters zu seinem Gegenstück in *B. subtilis* (Kempf und Bremer, 1995; Smits *et al.*, 2008; Hoffmann und Bremer, 2016; Hoffmann und Bremer, 2017) besteht, unterscheiden sich die entsprechenden Gencluster deutlich in ihrer Regulation. Während die *opuA* Expression in *B. subtilis* durch Salzstress induziert wird (Kempf und Bremer, 1995; Hoffmann *et al.*, 2013), ist dies für das *opuA* Gencluster aus *B. infantis* nur in geringem Maß der Fall (Abbildung 25). Mit Ausnahme solcher Systeme, die für den Import des Vorläufers Cholin für die Glycinbetain Synthese verantwortlich sind (Lamark *et al.*, 1991; Nau-Wagner *et al.*, 2012; Wargo, 2013; Chen *et al.*, 2013; Meadows und Wargo, 2018), ist die Expression von Genclustern für die Aufnahme von kompatiblen Soluten typischerweise nicht durch Substrate, sondern durch erhöhte Osmolaritäten induziert (Lucht und Bremer, 1994; Wood, 1999; Wood *et al.*, 2001; Bremer und Krämer, 2010; Krämer, 2010; Hoffmann und Bremer, 2016; Hoffmann und Bremer, 2017). Der geringe Einfluss unterschiedlicher Salinitäten auf die Genexpression könnte jedoch in Zusammenhang mit dem marinen Habitat von *B. infantis* stehen (Siefert *et al.*, 2000), in dem das Bakterium permanent hohen Salzkonzentrationen von etwa 0,6 M NaCl ausgesetzt ist, während terrestrische Organismen extremen Schwankungen in der umgebenden Osmolarität unterliegen können.

In *B. infantis* findet stattdessen eine Substrat vermittelte Induktion der *opuA* Transkription in Abhängigkeit des GbsR-Typ Repressors OpuAR statt [Abbildung 26A (Ronzheimer *et al.*, 2018)]. Hierbei wirken Glycinbetain, Prolinbetain und Cholin durch direkte Bindung an OpuAR als Induktoren (Ronzheimer, 2015; Ronzheimer *et al.*, 2018). Das regulatorische System stellt die *opuA* Expression dabei äußerst sensitiv in Abhängigkeit von der extrazellulären Induktorkonzentration ein (Abbildung 26B). Bei OpuA aus *B. infantis* handelt es sich um das erste osmoadaptive Transportsystem für kompatible Solute, dessen Expression einer solchen Regulation unterliegt. Transportsysteme für Osmolyte, deren Transkription durch Substrate induziert wird, stehen üblicherweise in Verbindung mit dem Katabolismus solcher Trimethylammonium Verbindungen (Wargo, 2013; Chen *et al.*, 2013; Meadows und Wargo, 2018). Dies trifft jedoch nicht auf das OpuA System zu, da *B. infantis* sowohl Glycinbetain als auch Cholin nicht als Kohlenstoffquelle nutzen kann (Ronzheimer, 2015; Ronzheimer *et al.*, 2018).

Die Wirkung von Cholin als Induktor ist verwunderlich, da es sich hierbei nicht um ein Substrat des OpuA Transporters handelt (Ronzheimer *et al.*, 2018). In Übereinstimmung mit

dem bioinformatischen Befund, dass das Genom von *B. infantis* (Massilamany *et al.*, 2016) keine Gene für die Synthese von Glycinbetain aus Cholin aufweist (Abbildung 7) übt Cholin darüber hinaus auch keine osmoprotektive Funktion in diesem marinen Vertreter der Gattung *Bacillus* aus (Ronzheimer *et al.*, 2018). In dem heterologen Wirtsorganismus *B. subtilis*, der für die Transkriptionsstudien verwendet wurde, erfolgt der Import von Cholin durch die Anwesenheit der Transporter OpuB und OpuC (Kappes *et al.*, 1999). Die Interaktion zwischen OpuAR und Cholin könnte somit auf die Strukturellen Ähnlichkeit zwischen der Ligandenbindetasche in OpuAR und denen bekannter Substratbindende Proteine für Cholin und Glycinbetain (Schiefner *et al.*, 2004a; Schiefner *et al.*, 2004b; Horn *et al.*, 2006; Oswald *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2011; Pittelkow *et al.*, 2011) zurückzuführen sein. Ähnliches konnte bereits für den Regulator der Prolin Import- und Katabolismusgene (*putBCP*), PutR in *B. subtilis* beobachtet werden. PutR Aktiviert Prolin-abhängig die Expression von *putBCP*. *In vivo* Transkriptionsstudien zeigten, dass auch das chemisch Ähnliche kompatible Solut Prolinbetain als Induktor fungiert, obwohl diese nicht verstoffwechselt werden kann (Moses *et al.*, 2012).

Die Analyse des regulatorischen OpuAR/*opuA* Systems erfolgte in *B. subtilis* als heterologen Wirtsorganismus. Ob die geschilderten Zusammenhänge auch im nativen Kontext zutreffen, könnte durch Northern-Blot Analysen überprüft werden. Es wäre zudem von Interesse, ob die Expression der Gene für den OpuF Transporters aus *B. infantis* (Teichmann *et al.*, 2018) auf ähnliche Weise determiniert wird. Angrenzend an das *opuF* Gencluster konnte kein Regulator identifiziert werden, der eine Substratinduktion vermitteln könnte. Jedoch wäre eine gemeinsame Regulation von *opuA* und *opuF* durch OpuAR denkbar.

22.1 RemA stellt eine Verbindung zwischen der Osmoprotektion und der Biofilmbildung in *B. subtilis* dar

Die Ausbildung von Biofilmen zählt zu den bakteriellen Sozialverhalten und bietet vorteilhafte Bedingungen für das Überleben in der natürlichen Umgebung sowie einen Schutz vor sich verändernden Umweltbedingungen (Costerton *et al.*, 1995; Cairns *et al.*, 2014). Die Zellen werden hierbei durch eine selbst produzierte extrazelluläre Matrix aus Polysacchariden, Proteinen und DNA zusammengehalten (Branda *et al.*, 2005). Im Fall von *B. subtilis* enthält die Biofilmmatrix die Proteine TasA und TapA, die durch das *tapA-sipW-tasA* Operon kodiert werden (Branda *et al.*, 2005; Ostrowski *et al.*, 2011). Die Synthese der Exopolysaccharide erfolgt durch die Produkte des 15 Gene enthaltene *epsA-O* (*eps*) Operons (Gerwig *et al.*, 2014). Eine hydrophobe Schicht aus dem bakteriellen Hydrophobin BslA umhüllt den Biofilm (Ostrowski *et al.*, 2011; Kobayashi and Iwano, 2012; Hobley *et al.*, 2013). Durch die Produktion großer Mengen an Exopolysacchariden entsteht ein osmotischer Druck im

inneren des Biofilms, der von Bedeutung für die Ausbreitung der Biofilm-Kolonie ist. Durch den osmotischen Druck wird zudem der Wassereinstrom in den Biofilm angetrieben, welcher der Verteilung von Nährstoffen über Flüssigkeitskanäle im inneren des Biofilms dient (Seminara *et al.*, 2012; Wilking *et al.*, 2013). Dieser Mechanismus ist nicht auf *B. subtilis* beschränkt. Die Ausdehnung von Biofilmen des Gram-negativen Bakteriums *Vibrio cholerae*, wird ebenfalls durch einen osmotischen Druckunterschied angetrieben (Yan *et al.*, 2017).

Die Expression der Biofilmmatrix Gene in *B. subtilis* ist abhängig, von der Aktivierung durch RemA [„regulator of extracellular matrix genes“ (Winkelman *et al.*, 2009)]. Microarray Analysen zeigten, dass das RemA Regulon nicht nur die Biofilmmatrix Gene beinhaltet, sondern auch Gene die am Stickstoffmetabolismus oder der zellulären Antwort auf osmotischen Stress beteiligt sind. Hierunter lassen sich die ABC-Transporter OpuA, OpuB und OpuC sowie der GbsR-Typ Repressor OpcR finden (Winkelman *et al.*, 2013).

Die Funktion von RemA als Aktivator der *opuB*, *opuC* und *opcR* Transkription konnte im Rahmen dieser Arbeit durch Reporterstudien bestätigt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die RemA-vermittelte Aktivierung der Genexpression auch in Abwesenheit der reprimierenden Transkriptionsfaktoren GbsR und OpcR von essentieller Bedeutung ist (Abbildung 38 und Abbildung 39). Die Regulation von *opuC* und *opcR* nimmt hierbei einen Sonderfall ein. Hier wird die Expression der Transportergene sowie die des angrenzenden Repressor Gens *opcR* durch die gleichen Faktoren bestimmt. Neben der osmotischen Induktion und der Repression durch OpcR ist dies auch der Fall für die Aktivierung durch RemA. Die für das *opuC* Operon, mittels Footprint Analyse bestimmten RemA-Bindestellen sind dabei zentral im intergenen Bereich zwischen *opuC* und *opcR* lokalisiert [Abbildung 57A (Jared Winkelman und Daniel Kearns, unveröffentlichte Daten)]. Individuelle Deletionen der RemA-Bindestellen wurden im Rahmen einer von mir betreuten Bachelorarbeit durch Lucas Schnabel angefertigt. Ihre Auswirkungen auf die *opuC* und *opcR* Transkription wurde mit Hilfe von Reporterfusionen analysiert. Diese Daten legen nahe, dass RemA für die Aktivierung beider Gene die gleichen DNA-Bindestellen bedient [Abbildung 57 (Schnabel, 2018)].

Durch die Funktion als Aktivator verschiedener Gencluster stellt RemA eine regulatorische Verknüpfung zwischen der Biofilmbildung und der zellulären Antwort auf osmotischen Stress in *B. subtilis* dar. Um den osmotischen Druck durch die Matrix Synthese zu kompensieren ist eine solche Verknüpfung vermutlich physiologisch Notwendig. Im Einklang hiermit konnte *B. subtilis* mit den Wurzeln verschiedener Pflanzen assoziiert vorgefunden werden. Die Anheftung der Zelle ist dabei abhängig von der Biofilmbildung, die durch pflanzliche Polysaccharide stimuliert wird (Chen *et al.*, 2012; Beauregard *et al.*, 2013; Vlamakis *et al.*, 2013). Zugleich stellen Pflanzen eine Quelle für kompatible Solute dar. Diese gelangen durch verrottendes Pflanzenmaterial oder Wurzelsekrete in den Boden, wodurch sie für die

B. subtilis Zellen des Biofilms verfügbar werden (Welsh, 2000; Warren, 2014; Bouskill *et al.*, 2016). Ihre effiziente Aufnahme wäre durch eine gesteigerte Expression der *opu* Gene ermöglicht.

Eine besonders starke osmotische Induktion des *opuB* und *opuC* Operons (Abbildung 30), sowie des *opcR* Gens (Abbildung 35B) erfolgt durch Saccharose. Dagegen erfolgt die Expression dieser Gene in Gegenwart isoosmolarer Konzentrationen der ionischen Osmolyte NaCl und KCl auf einem geringeren Level. Durch Glycerin erfolgt keine Induktion der Genexpression was durch die Membrangängigkeit dieses Osmolyts zu erklären ist (Abbildung 30 und Abbildung 35B). Obwohl Glycerin im Medium zu einer Erhöhung der Osmolarität führt kann daher kein osmotischer Druck auf die Zelle generiert werden. In Übereinstimmung mit diesem Befund konnte bereits gezeigt werden, dass Zucker wie Laktose und Saccharose in *B. subtilis* zu einer stärkeren osmotischen Induktion der *proHJ* (Brill *et al.*, 2011a) und *opuA* (Hoffmann *et al.*, 2013) Expression führen, als dies der Fall für ionische Osmolyte wie NaCl oder KCl der Fall ist. Dies könnte von zusätzlicher physiologischer Relevanz für *B. subtilis* Zellen innerhalb des Biofilms sein, in dem die Zellen von großen Mengen an Exopolysacchariden umgeben sind, was eine Anpassung an hohe extrazelluläre Osmolaritäten nötig macht (Branda *et al.*, 2005; Seminara *et al.*, 2012; Wilking *et al.*, 2013; Gerwig *et al.*, 2014).

Um die Verknüpfung zwischen der osmotischen Stressantwort und der Biofilmbildung genauer zu untersuchen müssten Genexpressionsstudien unter Biofilm-Bedingungen durchgeführt werden. Zu diesem Zweck könnten Fluoreszenzreporter genutzt werden. Hierdurch wäre auch zu erkennen, ob ein Zusammenhang zwischen der Genexpression und der Lokalisation der Zellen innerhalb des Biofilms besteht.

VII. Literaturverzeichnis

- Ahmann, D., Roberts, A.L., Krumholz, L.R., und Morel, F.M.** (1994) Microbe grows by reducing arsenic. *Nature* **371**: 750
- Alekshun, M.N., Kim, Y.S., und Levy, S.B.** (2002) Mutational analysis of MarR, the negative regulator of *marRAB* expression in *Escherichia coli*, suggests the presence of two regions required for DNA binding. *Mol Microbiol* **35**: 1394–1404
- Alekshun, M.N., und Levy, S.B.** (1997) Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 2067–2075
- Alekshun, M.N., und Levy, S.B.** (1999) Alteration of the repressor activity of MarR, the negative regulator of the *Escherichia coli marRAB* locus, by multiple chemicals *in vitro*. *J Bacteriol* **181**: 4669–4672
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., und Lipman, D.J.** (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410
- Ariza, R.R., Cohen, S.P., Bachhawat, N., Levy, S.B., und Demple, B.** (1994) Repressor mutations in the *marRAB* operon that activate oxidative stress genes and multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**: 143–148
- Arnhold, C.** (2011) Regulatorische und strukturelle Analyse des *Bacillus* sp. NRRL B-14911 ABC-Transporter OpuA. Philipps-Universität Marburg, Masterarbeit
- Atkinson, D.E.** (1977) Cellular energy metabolism and its regulation. Academic Press, New York, NY
- Bashir, A., Hoffmann, T., Kempf, B., Xie, X., Smits, S.H.J., und Bremer, E.** (2014a) Plant-derived compatible solutes proline betaine and betonine confer enhanced osmotic and temperature stress tolerance to *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **160**: 2283–2294
- Bashir, A., Hoffmann, T., Smits, S.H.J., und Bremer, E.** (2014b) Dimethylglycine provides salt and temperature stress protection to *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **80**: 2773–8275
- Beauregard, P.B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., und Kolter, R.** (2013) *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: E1621–30
- Berntsson, R.P.-A., Smits, S.H.J., Schmitt, L., Slotboom, D.-J., und Poolman, B.** (2010) A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett* **584**: 2606–2617
- Bervoets, I., und Charlier, D.** (2019) Diversity, versatility and complexity of bacterial gene regulation mechanisms: opportunities and drawbacks for applications in synthetic biology. *FEMS Microbiol Rev* doi: 10.1093/femsre/fuz001
- Birnboim, H.C., und Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513–1523
- Birukou, I., Seo, S.M., Schindler, B.D., Kaatz, G.W., und Brennan, R.G.** (2014) Structural mechanism of transcription regulation of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux operon *mepRA* by the MarR family repressor MepR. *Nucleic Acids Res* **42**: 2774–4788
- Blohn, C. von, Kempf, B., Kappes, R.M., und Bremer, E.** (1997) Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Mol Microbiol* **25**: 175–187

- Boch, J., Kempf, B., und Bremer, E.** (1994) Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *J Bacteriol* **176**: 5364–5371
- Boch, J., Kempf, B., Schmid, R., und Bremer, E.** (1996) Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the *gbsAB* genes. *J Bacteriol* **178**: 5121–9
- Boch, J., Nau-Wagner, G., Kneip, S., und Bremer, E.** (1997) Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *Arch Microbiol* **168**: 282–289
- Boivin, S., Kozak, S., und Meijers, R.** (2013) Optimization of protein purification and characterization using thermofluor screens. *Protein Expr Purif* **91**: 192–206
- Booth, I.R.** (2014) Bacterial mechanosensitive channels: progress towards an understanding of their roles in cell physiology. *Curr Opin Microbiol* **18**: 16–22
- Booth, I.R., und Blount, P.** (2012) The MscS and MscL families of mechanosensitive channels act as microbial emergency release valves. *J Bacteriol* **194**: 4802–4809
- Borisov, V.B., Gennis, R.B., Hemp, J., und Verkhovsky, M.I.** (2011) The cytochrome *bd* respiratory oxygen reductases. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* **1807**: 1398–1413
- Bourot, S., Sire, O., Trautwetter, A., Touzé, T., Wu, L.F., Blanco, C., und Bernard, T.** (2000) Glycine betaine-assisted protein folding in a *lysA* mutant of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**: 1050–1056
- Bouskill, N.J., Wood, T.E., Baran, R., Ye, Z., Bowen, B.P., Lim, H., Zhou, J., Van Nostrand, J.D., Nico, P., Northen, T.R., Silver, W.L. und Brodie, E.L.** (2016) Belowground response to drought in a tropical forest soil. I. changes in microbial functional potential and metabolism. *Front Microbiol* **7**: 525
- Bracher, S., Schmidt, C.C., Dittmer, S.I., und Jung, H.** (2016) Core Transmembrane domain 6 plays a pivotal role in the transport cycle of the sodium/proline symporter PutP. *J Biol Chem* **291**: 26208–26215
- Branda, S.S., Vik, Å., Friedman, L., und Kolter, R.** (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* **13**: 20–26
- Bremer, E., und Krämer, R.** (2010) Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes. In *Bacterial stress response*. Storz, G., und Hengge-Aronis, R. (eds). ASM Press, Washington, D.C. pp. 79–97.
- Brill, J., Hoffmann, T., Bleisteiner, M., und Bremer, E.** (2011a) Osmotically controlled synthesis of the compatible solute proline is critical for cellular defense of *Bacillus subtilis* against high osmolarity. *J Bacteriol* **193**: 5335–5346
- Brill, J., Hoffmann, T., Putzer, H., und Bremer, E.** (2011b) T-box-mediated control of the anabolic proline biosynthetic genes of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **157**: 977–87
- Brown, A.D., and Simpson, J.R.** (1972) Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J Gen Microbiol* **72**: 589–591
- Broy, S., Chen, C., Hoffmann, T., Brock, N.L., Nau-Wagner, G., Jebbar, M., Smits, S.H.J., Dickschat, J.S., und Bremer, E.** (2015) Abiotic stress protection by ecologically abundant dimethylsulfoniopropionate and its natural and synthetic derivatives: insights from *Bacillus subtilis*. *Environ Microbiol* **17**: 2362–2378

- Burkhardt, J., Sewald, X., Bauer, B., Saum, S.H., und Müller, V.** (2009) Synthesis of glycine betaine from choline in the moderate halophile *Halobacillus halophilus*: co-regulation of two divergent, polycistronic operons. *Environ Microbiol Rep* **1**: 38–43
- Cairns, L.S., Hobley, L., und Stanley-Wall, N.R.** (2014) Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: new insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Mol Microbiol* **93**: 587–598
- Chen, C., Li, S., McKeever, D.R., und Beattie, G.A.** (2013) The widespread plant-colonizing bacterial species *Pseudomonas syringae* detects and exploits an extracellular pool of choline in hosts. *Plant J* **75**: 891–902
- Chen, H., Luo, Q., Yin, J., Gao, T., und Gao, H.** (2015) Evidence for the requirement of CydX in function but not assembly of the cytochrome *bd* oxidase in *Shewanella oneidensis*. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* **1850**: 318–328
- Chen, I.-M.A., Markowitz, V.M., Chu, K., Palaniappan, K., Szeto, E., Pillay, M., Ratner, A., Huang, J., Andersen, E., Huntemann, M., Varghese, N., Hadjithomas, M., Tennessen, K., Nielsen, T., Ivanova, N.N., und Kyrpides, N.C.** (2017a) IMG/M: integrated genome and metagenome comparative data analysis system. *Nucleic Acids Res* **45**: D507–D516
- Chen, P.R., Bae, T., Williams, W.A., Duguid, E.M., Rice, P.A., Schneewind, O., und He, C.** (2006) An oxidation-sensing mechanism is used by the global regulator MgrA in *Staphylococcus aureus*. *Nat Chem Biol* **2**: 591–595
- Chen, S.-C., Sun, G.-X., Rosen, B.P., Zhang, S.-Y., Deng, Y., Zhu, B.-K., Rensing, C., und Zhu, Y.-G.** (2017b) Recurrent horizontal transfer of arsenite methyltransferase genes facilitated adaptation of life to arsenic. *Sci Rep* **7**: 7741
- Chen, Y., Cao, S., Chai, Y., Clardy, J., Kolter, R., Guo, J., und Losick, R.** (2012) A *Bacillus subtilis* sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the roots of tomato plants. *Mol Microbiol* **85**: 418–430
- Ciulla, R.A., Diaz, M.R., Taylor, B.F., und Roberts, M.F.** (1997) Organic osmolytes in aerobic bacteria from Mono Lake, an alkaline, moderately hypersaline environment. *Appl Environ Microbiol* **63**: 220–226
- Cohen, S.P., Levy, S.B., Foulds, J., und Rosner, J.L.** (1993) Salicylate induction of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: activation of the *mar* operon and a *mar*-independent pathway. *J Bacteriol* **175**: 7856–7862
- Costa, M.S. da, Santos, H., und Galinski, E.A.** (1998) An overview of the role and diversity of compatible solutes in *Bacteria* and *Archaea*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **61**: 117–153
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., und Lappin-Scott, H.M.** (1995) Microbial Biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**: 711–745
- Csonka, L.N.** (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev* **53**: 121–147
- Csonka, L.N., und Hanson, A.D.** (1991) Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu Rev Microbiol* **45**: 569–606
- Curran, T.D., Abacha, F., Hibberd, S.P., Rolfe, M.D., Lacey, M.M., und Green, J.** (2017) Identification of new members of the *Escherichia coli* K-12 MG1655 SlyA regulon. *Microbiology* **163**: 400–409

- Cutting, S.M., und Horn, P.B. Vander** (1990) Genetic analysis. In Molecular biological methods for *Bacillus*. Harwood, C.R., und Cutting, S.M. (eds). John Wiley & Sons, Inc., Chichester, United Kingdom. pp. 27–74.
- Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C., und Chen, J.** (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 317–364
- Davis, J.R., und Sello, J.K.** (2010) Regulation of genes in *Streptomyces* bacteria required for catabolism of lignin-derived aromatic compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**: 921–929
- Degli Esposti, M., Rosas-Pérez, T., Servín-Garcidueñas, L.E., Bolaños, L.M., Rosenblueth, M., und Martínez-Romero, E.** (2015) Molecular evolution of cytochrome *bd* oxidases across proteobacterial genomes. *Genome Biol Evol* **7**: 801–820
- Delano, W.L.** (2002) The PyMol molecular graphics system. Delano Scientific, San Carlos
- Deochand, D.K., und Grove, A.** (2017) MarR family transcription factors: dynamic variations on a common scaffold. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **52**: 595–613
- Devesa, V., Loos, A., Súñer, M.A., Vélez, D., Feria, A., Martínez, A., Montoro, R., und Sanz, Y.** (2005) Transformation of organoarsenical species by the microflora of freshwater crayfish. *J Agric Food Chem* **53**: 10297–10305
- Dorman, C.J., und Dorman, M.J.** (2016) DNA supercoiling is a fundamental regulatory principle in the control of bacterial gene expression. *Biophys Rev* **8**: 209–220
- Dougherty, D.A.** (1996) Cation- π interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science* **271**: 163–168
- Du, Y., Shi, W.-W., He, Y.-X., Yang, Y.-H., Zhou, C.-Z., und Chen, Y.** (2011) Structures of the substrate-binding protein provide insights into the multiple compatible solute binding specificities of the *Bacillus subtilis* ABC transporter OpuC. *Biochem J* **436**: 283–289
- Dubnau, D.** (1991) Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev* **55**: 395–424.
- Earl, A.M., Losick, R., und Kolter, R.** (2008) Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol* **16**: 269–275
- Edwardson, C.F., und Hollibaugh, J.T.** (2017) Metatranscriptomic analysis of prokaryotic communities active in sulfur and arsenic cycling in Mono Lake, California, USA. *ISME J* **11**: 2195–2208
- Eitinger, T., Rodionov, D.A., Grote, M., und Schneider, E.** (2011) Canonical and ECF-type ATP-binding cassette importers in prokaryotes: diversity in modular organization and cellular functions. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 3–67
- Evans, K., Adewoye, L., und Poole, K.** (2001) MexR repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of MexR binding sites in the *mexA-mexR* intergenic region. *J Bacteriol* **183**: 807–812
- Falkenberg, P., und Strøm, A.R.** (1990) Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1034**: 253–259
- Fischer, K.E.** (2012) Eine neue facette im intrazellulären Anpassungsmechanismus von *Bacillus subtilis* an hohe Salinitäten: Die Analyse des osmotisch Induzierten *yqiHIK* Operons. Philipps-Universität Marburg, Dissertation
- Fischer, K.E., und Bremer, E.** (2012) Activity of the osmotically regulated *yqiHIK* promoter from *Bacillus subtilis* is controlled at a distance. *J Bacteriol* **194**: 5197–5208

- Fischer, M.** (2017) Genetische Analyse der vermuteten Induktor-Bindestelle des GbsR Repressors aus *Bacillus subtilis*. Philipps-Universität Marburg, Bachelorarbeit
- Ford, R.C., und Beis, K.** (2019) Learning the ABCs one at a time: structure and mechanism of ABC transporters. *Biochem Soc Trans* doi: 10.1042/BST20180147
- Fuangthong, M., Atichartpongkul, S., Mongkolsuk, S., und Helmann, J.D.** (2001) OhrR is a repressor of *ohrA*, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 4134–4141
- Galán, B., Kolb, A., Sanz, J.M., García, J.L., und Prieto, M.A.** (2003) Molecular determinants of the *hpa* regulatory system of *Escherichia coli*: the HpaR repressor. *Nucleic Acids Res* **31**: 6598–6609
- Galinski, E.A., und Trüper, H.G.** (1994) Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **15**: 95–108
- George, A.M., und Levy, S.B.** (1983a) Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol, and other antibiotics in *Escherichia coli*: involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline. *J Bacteriol* **155**: 531–540
- George, A.M., und Levy, S.B.** (1983b) Gene in the major cotransduction gap of the *Escherichia coli* K-12 linkage map required for the expression of chromosomal resistance to tetracycline and other antibiotics. *J Bacteriol* **155**: 541–548
- Gerwig, J., Kiley, T.B., Gunka, K., Stanley-Wall, N., und Stülke, J.** (2014) The protein tyrosine kinases EpsB and PtkA differentially affect biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **160**: 682–691
- Glöckner, F.O., Yilmaz, P., Quast, C., Gerken, J., Beccati, A., Ciuprina, A., Bruns, G., Yarza, P., Peplies, J., Westram, R., und Ludwig, W.** (2017) 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *J Biotechnol* **261**: 169–176
- González-Pastor, J.E.** (2011) Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 415–424
- Gotsche, S., und Dahl, M.K.** (1995) Purification and characterization of the phospho-alpha(1,1)glucosidase (TreA) of *Bacillus subtilis* 168. *J Bacteriol* **177**: 2721–2726
- Grove, A.** (2013) MarR family transcription factors. *Curr Biol* **23**: R142–R143
- Grove, A.** (2017) Regulation of metabolic pathways by MarR family transcription factors. *Comput Struct Biotechnol J* **15**: 366–371
- Gu, Z.J., Wang, L., Rudulier, D. Le, Zhang, B., und Yang, S.S.** (2008) Characterization of the glycine betaine biosynthetic genes in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8T. *Curr Microbiol* **57**: 306–311
- Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., und Oren, A.** (2018) Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiol Rev* **42**: 353–375
- Gundlach, J., Herzberg, C., Kaever, V., Gunka, K., Hoffmann, T., Weiß, M., Gibhardt, J., Thürmer, A., Hertel, D., Daniel, R., Bremer, E., Commichau, F.M., und Stülke, J.** (2017) Control of potassium homeostasis is an essential function of the second messenger cyclic di-AMP in *Bacillus subtilis*. *Sci Signal* **10**: eaal3011

- Gupta, A., Pande, A., Sabrin, A., Thapa, S.S., Gioe, B.W., und Grove, A.** (2019) MarR family transcription factors from *Burkholderia* species: hidden clues to control of virulence-associated genes. *Microbiol Mol Biol Rev* **83**: e00039-18
- Hahne, H., Mäder, U., Otto, A., Bonn, F., Steil, L., Bremer, E., Hecker, M., und Becher, D.** (2010) A comprehensive proteomics and transcriptomics analysis of *Bacillus subtilis* salt stress adaptation. *J Bacteriol* **192**: 870–882
- Hanson, A.D., May, A.M., Grumet, R., Bode, J., Jamieson, G.C., und Rhodes, D.** (1985) Betaine synthesis in chenopods: localization in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 3678–3682
- Harwood, C.R., und Archibald, A.R.** (1990) Growth, maintenance and general techniques. In *Molecular biological methods for Bacillus*. Harwood, C.R., und Cutting, S.M. (eds). John Wiley & Sons, Inc., Chichester, United Kingdom. pp. 1–26
- Haswell, E.S., Phillips, R., und Rees, D.C.** (2011) Mechanosensitive channels: what can they do and how do they do it? *Structure* **19**: 1356–1369
- Heide, T. van der, und Poolman, B.** (2002) ABC transporters: one, two or four extracytoplasmic substrate-binding sites? *EMBO Rep* **3**: 938–943
- Helfert, C., Gotsche, S., und Dahl, M.K.** (1995) Cleavage of trehalose-phosphate in *Bacillus subtilis* is catalysed by a phospho-alpha-(1-1)-glucosidase encoded by the *treA* gene. *Mol Microbiol* **16**: 111–120
- Hobley, L., Ostrowski, A., Rao, F. V, Bromley, K.M., Porter, M., Prescott, A.R., MacPhee, C.E., van Aalten, D.M.F., und Stanley-Wall, N.R.** (2013) BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the *Bacillus subtilis* biofilm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 13600–13605
- Hoeser, J., Hong, S., Gehmann, G., Gennis, R.B., und Friedrich, T.** (2014) Subunit CydX of *Escherichia coli* cytochrome *bd* ubiquinol oxidase is essential for assembly and stability of the di-heme active site. *FEBS Lett* **588**: 1537–1541
- Hoffmann, T., Bleisteiner, M., Sappa, P.K., Steil, L., Mäder, U., Völker, U., und Bremer, E.** (2017) Synthesis of the compatible solute proline by *Bacillus subtilis*: point mutations rendering the osmotically controlled *proHJ* promoter hyperactive. *Environ Microbiol* **19**: 3700–3720
- Hoffmann, T., Blohn, C. von, Stanek, A., Moses, S., Barzantny, H., und Bremer, E.** (2012) Synthesis, release, and recapture of compatible solute proline by osmotically stressed *Bacillus subtilis* cells. *Appl Environ Microbiol* **78**: 5753–5762
- Hoffmann, T., und Bremer, E.** (2011) Protection of *Bacillus subtilis* against cold stress via compatible-solute acquisition. *J Bacteriol* **193**: 1552–62
- Hoffmann, T., und Bremer, E.** (2016) Management of osmotic Stress by *Bacillus subtilis*: genetics and physiology. In *Stress and environmental regulation of gene expression and adaptation in bacteria*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. pp. 657–676
- Hoffmann, T., und Bremer, E.** (2017) Guardians in a stressful world: the Opu family of compatible solute transporters from *Bacillus subtilis*. *Biol Chem* **398**: 193–214
- Hoffmann, T., Warmbold, B., Smits, S.H.J., Tschapek, B., Ronzheimer, S., Bashir, A., Chen, C., Rolbetzki, A., Pittelkow, M., Jebbar, M., Seubert, A., Schmitt, L., und Bremer, E.** (2018) Arsenobetaine: an ecophysiological important organoarsenical confers cytoprotection against osmotic stress and growth temperature extremes. *Environ Microbiol* **20**: 305–323

- Hoffmann, T., Wensing, A., Brosius, M., Steil, L., Völker, U., und Bremer, E.** (2013) Osmotic control of *opuA* expression in *Bacillus subtilis* and its modulation in response to intracellular glycine betaine and proline pools. *J Bacteriol* **195**: 510–522
- Holtmann, G., Bakker, E.P., Uozumi, N., und Bremer, E.** (2003) KtrAB and KtrCD: two K⁺ uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *J Bacteriol* **185**: 1289–98
- Holtmann, G., und Bremer, E.** (2004) Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of Opu transporters. *J Bacteriol* **186**: 1683–93
- Hommais, F., Oger-Desfeux, C., Gijsegem, F. Van, Castang, S., Ligori, S., Expert, D., Nasser, W., und Reverchon, S.** (2008) PecS is a global regulator of the symptomatic phase in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J Bacteriol* **190**: 7508–7522
- Horn, C., Jenewein, S., Sohn-Bösser, L., Bremer, E., und Schmitt, L.** (2005) Biochemical and structural analysis of the *Bacillus subtilis* ABC transporter OpuA and its isolated subunits. *J Mol Microbiol Biotechnol* **10**: 76–91
- Horn, C., Sohn-Bösser, L., Breed, J., Welte, W., Schmitt, L., und Bremer, E.** (2006) Molecular determinants for substrate specificity of the ligand-binding protein OpuAC from *Bacillus subtilis* for the compatible solutes glycine betaine and proline betaine. *J Mol Biol* **357**: 592–606
- Huang, J.H., Scherr, F., und Matzner, E.** (2007) Demethylation of dimethylarsenic acid and arsenobetaine. *Water Air Soil Pollut* **182**: 31–41
- Ignatova, Z., und Gierasch, L.M.** (2006) Inhibition of protein aggregation *in vitro* and *in vivo* by a natural osmoprotectant. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 13357–13361
- Ikuta, S., Imamura, S., Misaki, H., und Horiuti, Y.** (1977) Purification and characterization of choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*. *J Biochem* **82**: 1741–1749
- Ishikura, K., Nitta, Y., und Watanabe, T.** (1977) Hydrolysis of phenyl beta-maltoside catalyzed by saccharifying alpha-amylase from *Bacillus subtilis*. *J Biochem* **81**: 1187–1192
- Jones, S.A., Chowdhury, F.Z., Fabich, A.J., Anderson, A., Schreiner, D.M., House, A.L., Autieri, S.M., Leatham, M.P., Lins, J.J., Jorgensen, M., Cohen, P.S., und Conway, T.** (2007) Respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Infect Immun* **75**: 4891–4899
- Jung, H., Hilger, D., und Raba, M.** (2012) The Na⁺/L-proline transporter PutP. *Front Biosci Landmark Ed* **17**: 745–759
- Kaise, T., Watanabe, S., und Itoh, K.** (1985) The acute toxicity of arsenobetaine. *Chemosphere* **14**: 1327–1332
- Kappes, R.M., Kempf, B., Kneip, S., Boch, J., Gade, J., Meier-Wagner, J., und Bremer, E.** (1999) Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **32**: 203–216
- Katoh, K., Rozewicki, J., und Yamada, K.D.** (2017) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform* doi:10.1093/bib/bbx108
- Kempf, B., und Bremer, E.** (1995) OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **270**: 16701–13

- Kempf, B., und Bremer, E.** (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol* **170**: 319–330
- Kempf, B., Gade, J., und Bremer, E.** (1997) Lipoprotein from the osmoregulated ABC transport system OpuA of *Bacillus subtilis*: purification of the glycine betaine binding protein and characterization of a functional lipidless mutant. *J Bacteriol* **179**: 6213–6220
- Kimura, Y., Kawasaki, S., Yoshimoto, H., und Takegawa, K.** (2010) Glycine betaine biosynthesized from glycine provides an osmolyte for cell growth and spore germination during osmotic stress in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **192**: 1467–1470
- Knapp, S., Ladenstein, R., und Galinski, E.A.** (1999) Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes beta-hydroxyectoine and betaine. *Extremophiles* **3**: 191–198
- Kobayashi, K., und Iwano, M.** (2012) BslA (YuaB) forms a hydrophobic layer on the surface of *Bacillus subtilis* biofilms. *Mol Microbiol* **85**: 51–66
- Krämer, R.** (2010) Bacterial stimulus perception and signal transduction: response to osmotic stress. *Chem Rec* **10**: 217–229
- Kuhlmann, A.U., und Bremer, E.** (2002) Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus spp.*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 772–783
- Kumarevel, T., Tanaka, T., Umehara, T., und Yokoyama, S.** (2009) ST1710–DNA complex crystal structure reveals the DNA binding mechanism of the MarR family of regulators. *Nucleic Acids Res* **37**: 4723–4735
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685
- Lai, M.C., Sowers, K.R., Robertson, D.E., Roberts, M.F., und Gunsalus, R.P.** (1991) Distribution of compatible solutes in the halophilic methanogenic archaeobacteria. *J Bacteriol* **173**: 5352–5358
- Lai, M.C., Yang, D.R., und Chuang, M.J.** (1999) Regulatory factors associated with synthesis of the osmolyte glycine betaine in the halophilic methanoarchaeon *Methanohalophilus portucalensis*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 828–833
- Lamark, T., Kaasen, I., Eshoo, M.W., Falkenberg, P., McDougall, J., und Strøm, A.R.** (1991) DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**: 1049–1064
- Lang, S., Cressatti, M., Mendoza, K.E., Coumoundouros, C.N., Plater, S.M., Culham, D.E., Kimber, M.S., und Wood, J.M.** (2015) YehZYXW of *Escherichia coli* is a low-affinity, non-osmoregulatory betaine-specific ABC transporter. *Biochemistry* **54**: 5735–5747
- Laverman, A.M., Blum, J.S., Schaefer, J.K., Phillips, E., Lovley, D.R., und Oremland, R.S.** (1995) Growth of strain SES-3 with arsenate and other diverse electron acceptors. *Appl Environ Microbiol* **61**: 3556–3561
- Lee, C.-H., Wu, T.-Y., und Shaw, G.-C.** (2013) Involvement of OpcR, a GbsR-type transcriptional regulator, in negative regulation of two evolutionarily closely related choline uptake genes in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **159**: 2087–2096
- Letunic, I., und Bork, P.** (2016) Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res* **44**: W242–245

- Lewinson, O., und Livnat-Levanon, N.** (2017) Mechanism of action of ABC importers: conservation, divergence, and physiological adaptations. *J Mol Biol* **429**: 606–619
- Li, J., Pawitwar, S.S., und Rosen, B.P.** (2016) The organoarsenical biocycle and the primordial antibiotic methylarsenite. *Metallomics* **8**: 1047–1055
- Lim, D., Poole, K., und Strynadka, N.C.J.** (2002) Crystal structure of the MexR repressor of the *mexRAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **277**: 29253–29259
- Löbach, S.** (2015) Das DegS-DegU Zwei-Komponenten System und dessen Rolle bei der Regulation des osmotisch induzierbaren *yqiHIK* Operons aus *Bacillus subtilis*. Philipps-Universität Marburg, Dissertation
- Locher, K.P.** (2016) Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat Struct Mol Biol* **23**: 487–493
- Loisel-Meyer, S., Jiménez de Bagüés, M.P., Köhler, S., Liautard, J.-P., und Jubier-Maurin, V.** (2005) Differential use of the two high-oxygen-affinity terminal oxidases of *Brucella suis* for *in vitro* and intramacrophagic multiplication. *Infect Immun* **73**: 7768–7771
- Lucht, J.M., und Bremer, E.** (1994) Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system ProU. *FEMS Microbiol Rev* **14**: 3–20
- Ma, J.C., und Dougherty, D.A.** (1997) The Cation- π interaction. *Chem Rev* **97**: 1303–1324
- Mahadevi, A.S., und Sastry, G.N.** (2013) Cation- π interaction: its role and relevance in chemistry, biology, and material science. *Chem Rev* **113**: 2100–2138
- Mahmood, N.A.B.N., Biemans-Oldenhinkel, E., Patzlaff, J.S., Schuurman-Wolters, G.K., und Poolman, B.** (2006) Ion specificity and ionic strength dependence of the osmoregulatory ABC transporter OpuA. *J Biol Chem* **281**: 29830–29839
- Mandic-Mulec, I., Stefanic, P., und van Elsas, J.D.** (2015) Ecology of *Bacillaceae*. *Microbiol Spectr* **3**: TBS-0017-2013
- Marmur, J., und Doty, P.** (1961) Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. *J Mol Biol* **3**: 585–594
- Martin, R.G., Jair, K.W., Wolf, R.E., und Rosner, J.L.** (1996) Autoactivation of the *marRAB* multiple antibiotic resistance operon by the MarA transcriptional activator in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 2216–2223
- Martin, R.G., und Rosner, J.L.** (1995) Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to *mar* operator sequences. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 5456–5460
- Massilamany, C., Mohammed, A., Loy, J.D., Purvis, T., Krishnan, B., Basavalingappa, R.H., Kelley, C.M., Guda, C., Barletta, R.G., Moriyama, E.N., Smith, T.P.L., und Reddy, J.** (2016) Whole genomic sequence analysis of *Bacillus infantis*: defining the genetic blueprint of strain NRRL B-14911, an emerging cardiopathogenic microbe. *BMC Genomics* **17**: 511
- Mead, D.A., Lucas, S., Copeland, A., Lapidus, A., Cheng, J.-F., Bruce, D.C., Goodwin, L.A., Pitluck, S., Chertkov, O., Zhang, X., Detter, J.C., Han, C.S., Tapia, R., Land, M., Hauser, L.J., Chang, Y.-J., Kyrpides, N.C., Ivanova, N.N., Ovchinnikova, G., Woyke, T., Brumm, C., Hochstein, R., Schoenfeld, T., und Brumm, P.** (2012) Complete genome sequence of *Paenibacillus* strain Y4.12MC10, a novel *Paenibacillus lautus* strain isolated from Obsidian Hot Spring in Yellowstone National Park. *Stand Genomic Sci* **6**: 381–400

- Meadows, J.A., und Wargo, M.J.** (2018) Transcriptional regulation of carnitine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* by CdhR. *mSphere* **3**: e00480-17
- Miller, J.H.** (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Molin, M., Ulven, S.M., Meltzer, H.M., und Alexander, J.** (2015) Arsenic in the human food chain, biotransformation and toxicology - review focusing on seafood arsenic. *J Trace Elem Med Biol* **31**: 249–259
- Moses, S., Sinner, T., Zaprasis, A., Stöveken, N., Hoffmann, T., Belitsky, B.R., Sonenshein, A.L., und Bremer, E.** (2012) Proline utilization by *Bacillus subtilis*: uptake and catabolism. *J Bacteriol* **194**: 745–758
- Mukhopadhyay, R., Rosen, B.P., Phung, L.T., und Silver, S.** (2002) Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 311–325
- Nau-Wagner, G., Oppen, D., Rolbetzki, A., Boch, J., Kempf, B., Hoffmann, T., und Bremer, E.** (2012) Genetic control of osmoadaptive glycine betaine synthesis in *Bacillus subtilis* through the choline-sensing and glycine betaine-responsive GbsR repressor. *J Bacteriol* **194**: 2703–2714
- Navarre, W.W., Halsey, T.A., Walther, D., Frye, J., McClelland, M., Potter, J.L., Kenney, L.J., Gunn, J.S., Fang, F.C., und Libby, S.J.** (2005) Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. *Mol Microbiol* **56**: 492–508
- Nearing, M.M., Koch, I., und Reimer, K.J.** (2015) Uptake and transformation of arsenic during the vegetative life stage of terrestrial fungi. *Environ Pollut* **197**: 108–115
- Nicolas, P., Mäder, U., Dervyn, E., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., Bidnenko, E., Marchadier, E., Hoebeke, M., Aymerich, S., Becher, D., Bisicchia, P., Botella, E., Delumeau, O., Doherty, G., Denham, E.L., Fogg, M.J., Fromion, V., Goelzer, A., Hansen, A., Härtig, E., Harwood, C.R., Homuth, G., Jarmer, H., Jules, M., Klipp, E., Le Chat, L., Lecointe, F., Lewis, P., Liebermeister, W., March, A., Mars, R.A.T., Nannapaneni, P., Noone, D., Pohl, S., Rinn, B., Rügheimer, F., Sappa, P.K., Samson, F., Schaffer, M., Schwikowski, B., Steil, L., Stülke, J., Wiegert, T., Devine, K., Wilkinson, A.J., van Dijk, J.M., Hecker, M., Völker, U., Bessi res, P., und Noirot, P.** (2012) Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* **335**: 1103–1106
- Nriagu, J.O.** (2002) Arsenic poisoning through the ages. In Environmental chemistry of arsenic. Frankenberger Jr., W.T. (ed.). Marcel Dekker Inc., New York, NY. pp. 1–26
- Nyyss l , A., Kerovuo, J., Kaukinen, P., Weymarn, N. von, und Reinikainen, T.** (2000) Extreme halophiles synthesize betaine from glycine by methylation. *J Biol Chem* **275**: 22196–22201
- Nyyssola, A., Reinikainen, T., und Leisola, M.** (2001) Characterization of glycine sarcosine N-methyltransferase and sarcosine dimethylglycine N-methyltransferase. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2044–2050
- Obis, D., Guillot, A., Gripon, J.C., Renault, P., Bolotin, A., und Mistou, M.Y.** (1999) Genetic and biochemical characterization of a high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters. *J Bacteriol* **181**: 6238–6246

- Ohta-Fukuyama, M., Miyake, Y., Emi, S., und Yamano, T.** (1980) Identification and properties of the prosthetic group of choline oxidase from *Alcaligenes sp.* *J Biochem* **88**: 197–203
- Oremland, R.S., Newmann, D.F., Wail, B.W., und Stolz, J.F.** (2002) Bacterial respiration of arsenate and its significance in the environment. In Environmental chemistry of arsenic. Frankenberger Jr., W.T. (ed.). Marcel Dekker Inc., New York, NY. pp. 273–296
- Oremland, R.S., und Stolz, J.F.** (2003) The ecology of arsenic. *Science* (80-) **300**: 939–944
- Oren, A.** (1999) Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 334–348
- Oren, A.** (2013) Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations, and acidic proteomes. *Front Microbiol* **4**: 315
- Ostrowski, A., Mehert, A., Prescott, A., Kiley, T.B., und Stanley-Wall, N.R.** (2011) YuaB functions synergistically with the exopolysaccharide and TasA amyloid fibers to allow biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **193**: 4821–4831
- Oswald, C., Smits, S.H.J., Höing, M., Sohn-Bösser, L., Dupont, L., Le Rudulier, D., Schmitt, L., und Bremer, E.** (2008) Crystal structures of the choline/acetylcholine substrate-binding protein ChoX from *Sinorhizobium meliloti* in the liganded and unliganded-closed states. *J Biol Chem* **283**: 32848–32859
- Panmanee, W., Vattanaviboon, P., Poole, L.B., und Mongkolsuk, S.** (2006) Novel organic hydroperoxide-sensing and responding mechanisms for OhrR, a major bacterial sensor and regulator of organic hydroperoxide stress. *J Bacteriol* **188**: 1389–1395
- Peddie, B.A., Lever, M., Hayman, C.M., Randall, K., und Chambers, S.T.** (1994) Relationship between osmoprotection and the structure and intracellular accumulation of betaines by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **120**: 125–131
- Perera, I.C., und Grove, A.** (2010) Molecular mechanisms of ligand-mediated attenuation of DNA binding by MarR family transcriptional regulators. *J Mol Cell Biol* **2**: 243–254
- Perez, C., Faust, B., Mehdipour, A.R., Francesconi, K.A., Forrest, L.R., und Ziegler, C.** (2014) Substrate-bound outward-open state of the betaine transporter BetP provides insights into Na⁺ coupling. *Nat Commun* **5**: 4231
- Pesaro, M., und Widmer, F.** (2002) Identification of novel Crenarchaeota and Euryarchaeota clusters associated with different depth layers of a forest soil. *FEMS Microbiol Ecol* **42**: 89–98
- Pike, A.C.W., Garman, E.F., Krojer, T., von Delft, F., und Carpenter, E.P.** (2016) An overview of heavy-atom derivatization of protein crystals. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* **D72**: 303–318
- Pittelkow, M., Tschapek, B., Smits, S.H.J., Schmitt, L., und Bremer, E.** (2011) The crystal structure of the substrate-binding protein OpuBC from *Bacillus subtilis* in complex with choline. *J Mol Biol* **411**: 53–67
- Popowich, A., Zhang, Q., und Le, X.C.** (2016) Arsenobetaine: the ongoing mystery. *Natl Sci Rev* **3**: 451–458
- Providenti, M.A., und Wyndham, R.C.** (2001) Identification and functional characterization of CbaR, a MarR-like modulator of the *cbaABC*-encoded chlorobenzoate catabolism pathway. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3530–3541

- Rathinasabapathi, B., Burnet, M., Russell, B.L., Gage, D.A., Liao, P.C., Nye, G.J., Scott, P., Golbeck, J.H., und Hanson, A.D.** (1997) Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: prosthetic group characterization and cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 3454–3458
- Ray, S.S., Bonanno, J.B., Chen, H., de Lencastre, H., Wu, S., Tomasz, A., und Burley, S.K.** (2003) X-ray structure of an *M. jannaschii* DNA-binding protein: implications for antibiotic resistance in *S. aureus*. *Proteins Struct Funct Bioinforma* **50**: 170–173
- Reed, R.H., Borowitzka, L.J., Mackay, M.A., Chudek, J.A., Foster, R., Warr, S.C.R., Moore, D.J., und Stewart, W.D.P.** (1986) Organic solute accumulation in osmotically stressed cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* **39**: 51–56
- Reuter, M., Hayward, N.J., Black, S.S., Miller, S., Dryden, D.T.F., und Booth, I.R.** (2014) Mechanosensitive channels and bacterial cell wall integrity: does life end with a bang or a whimper? *J R Soc Interface* **11**: 20130850
- Roesser, M., und Müller, V.** (2001) Osmoadaptation in *Bacteria* and *Archaea*: common principles and differences. *Environ Microbiol* **3**: 743–754
- Ronzheimer, S.** (2015) GbsR-Typ Regulatoren: Charakterisierung einer neuen MarR-Typ Regulator Familie von transkriptionellen Repressoren. Philipps-Universität Marburg, Dissertation
- Ronzheimer, S., Warmbold, B., Arnhold, C., und Bremer, E.** (2018) The GbsR family of transcriptional regulators: functional characterization of the OpuAR repressor. *Front Microbiol* **9**: 2536
- Rosenstein, R., Futter-Bryniok, D., und Götz, F.** (1999) The choline-converting pathway in *Staphylococcus xylosus* C2A: genetic and physiological characterization. *J Bacteriol* **181**: 2273–2278
- Rozwadowski, K.L., Khachatourians, G.G., und Selvaraj, G.** (1991) Choline oxidase, a catabolic enzyme in *Arthrobacter pascens*, facilitates adaptation to osmotic stress in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**: 472–478
- Salvi, F., Wang, Y.-F., Weber, I.T., und Gadda, G.** (2014) Structure of choline oxidase in complex with the reaction product glycine betaine. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* **70**: 405–413
- Sambrook, J., und Russell, D.W.** (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Scheepers, G.H., Lycklama a Nijeholt, J.A., und Poolman, B.** (2016) An updated structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett* **590**: 4393–4401
- Schiefner, A., Breed, J., Bösner, L., Kneip, S., Gade, J., Holtmann, G., Diederichs, K., Welte, W., und Bremer, E.** (2004a) Cation- π interactions as determinants for binding of the compatible solutes glycine betaine and proline betaine by the periplasmic ligand-binding protein ProX from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**: 5588–5596
- Schiefner, A., Holtmann, G., Diederichs, K., Welte, W., und Bremer, E.** (2004b) Structural basis for the binding of compatible solutes by ProX from the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *J Biol Chem* **279**: 48270–48281
- Schnabel, L.** (2018) Regulation von *opuC* und *opuCR* durch das RemA-Aktivatorprotein in *Bacillus subtilis*. Philipps-Universität Marburg, Bachelorarbeit

- Schumann, O.** (2015) Identifizierung der Bindestelle des Regulators GbsR vor dem *gbsAB* Operon in *Bacillus subtilis*. Philipps-Universität Marburg, Bachelorarbeit
- Seibert, T.M.** (2008) Die Zellwand-Hydrolase YocH aus *Bacillus subtilis*: Genetische Kontrolle durch das essentielle Zwei-Komponenten System YycFG, hohe Osmolarität und Kältestress. Philipps-Universität Marburg, Dissertation
- Seminara, A., Angelini, T.E., Wilking, J.N., Vlamakis, H., Ebrahim, S., Kolter, R., Weitz, D.A., und Brenner, M.P.** (2012) Osmotic spreading of *Bacillus subtilis* biofilms driven by an extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 1116–1121
- Shi, L., Sohaskey, C.D., Kana, B.D., Dawes, S., North, R.J., Mizrahi, V., und Gennaro, M.L.** (2005) Changes in energy metabolism of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse lung and under *in vitro* conditions affecting aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 15629–15634
- Shikuma, N.J., Davis, K.R., Fong, J.N.C., und Yildiz, F.H.** (2013) The transcriptional regulator, CosR, controls compatible solute biosynthesis and transport, motility and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Environ Microbiol* **15**: 1387–1399
- Siefert, J.L., Larios-Sanz, M., Nakamura, L.K., Slepecky, R.A., Paul, J.H., Moore, E.R.B., Fox, G.E., und Jurtshuk, Jr., P.** (2000) Phylogeny of marine *Bacillus* isolates from the Gulf of Mexico. *Curr Microbiol* **41**: 84–88
- Slyemi, D., und Bonnefoy, V.** (2012) How prokaryotes deal with arsenic. *Environ Microbiol Rep* **4**: 571–586
- Smith, J.L., Goldberg, J.M., und Grossman, A.D.** (2014) Complete genome sequences of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* laboratory strains JH642 (AG174) and AG1839. *Genome Announc* **2**: e00663-14
- Smits, S.H.J., Höing, M., Lecher, J., Jebbar, M., Schmitt, L., und Bremer, E.** (2008) The compatible-solute-binding protein OpuAC from *Bacillus subtilis*: ligand binding, site-directed mutagenesis, and crystallographic studies. *J Bacteriol* **190**: 5663–5671
- Stadtmiller, S.S., Gorensek-Benitez, A.H., Guseman, A.J., und Pielak, G.J.** (2017) Osmotic shock induced protein destabilization in living cells and its reversal by glycine betaine. *J Mol Biol* **429**: 1155–1161
- Steil, L., Hoffmann, T., Budde, I., Völker, U., und Bremer, E.** (2003) Genome-wide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *J Bacteriol* **185**: 6358–6370
- Stolz, J.F., Ellis, D.J., Blum, J.S., Ahmann, D., Lovley, D.R., und Oremland, R.S.** (1999) *Sulfurospirillum barnesii* sp. nov. and *Sulfurospirillum arsenophilum* sp. nov., new members of the *Sulfurospirillum* clade of the ϵ Proteobacteria. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 1177–1180
- Street, T.O., Bolen, D.W., und Rose, G.D.** (2006) A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 13997–14002
- Sukchawalit, R., Loprasert, S., Atichartpongkul, S., und Mongkolsuk, S.** (2001) Complex regulation of the organic hydroperoxide resistance gene (*ohr*) from *Xanthomonas* involves OhrR, a novel organic peroxide-inducible negative regulator, and posttranscriptional modifications. *J Bacteriol* **183**: 4405–4412
- Sulavik, M.C., Gambino, L.F., und Miller, P.F.** (1995) The MarR repressor of the multiple antibiotic resistance (*mar*) operon in *Escherichia coli*: prototypic member of a family of bacterial regulatory proteins involved in sensing phenolic compounds. *Mol Med* **1**: 436–446

- Taylor, V., Goodale, B., Raab, A., Schwerdtle, T., Reimer, K., Conklin, S., Karagas, M.R., und Francesconi, K.A.** (2017) Human exposure to organic arsenic species from seafood. *Sci Total Environ* **580**: 266–282
- Teichmann, L.** (2018) Molekulare Autopsie der nah verwandten ABC-Transporter OpuB und OpuC aus *Bacillus subtilis*. Philipps-Universität Marburg, Dissertation
- Teichmann, L., Chen, C., Hoffmann, T., Smits, S.H.J., Schmitt, L., und Bremer, E.** (2017) From substrate specificity to promiscuity: hybrid ABC transporters for osmoprotectants. *Mol Microbiol* **104**: 761–780
- Teichmann, L., Kümmel, H., Warmbold, B., and Bremer, E.** (2018) OpuF, a new *Bacillus* compatible solute ABC transporter with a substrate-binding protein fused to the transmembrane domain. *Appl Environ Microbiol* **84**: e01728-18
- Thomas, D.J., und Bradham, K.** (2016) Role of complex organic arsenicals in food in aggregate exposure to arsenic. *J Environ Sci* **49**: 86–96
- Tschapek, B., Pittelkow, M., Sohn-Böscher, L., Holtmann, G., Smits, S.H.J., Gohlke, H., Bremer, E., und Schmitt, L.** (2011) Arg149 is involved in switching the low affinity, open state of the binding protein AfProX into its high affinity, closed state. *J Mol Biol* **411**: 36–52
- Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C.A., und Vollmer, W.** (2012) From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol* **10**: 123–136
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R., und Kolter, R.** (2013) Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol* **11**: 157–168
- Waditee, R., Bhuiyan, M.N.H., Rai, V., Aoki, K., Tanaka, Y., Hibino, T., Suzuki, S., Takano, J., Jagendorf, A.T., Takabe, T., und Takabe, T.** (2005) Genes for direct methylation of glycine provide high levels of glycinebetaine and abiotic-stress tolerance in *Synechococcus* and *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1318–1323
- Wargo, M.J.** (2013) Homeostasis and catabolism of choline and glycine betaine: lessons from *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **79**: 2112–2120
- Warren, C.** (2016) Do microbial osmolytes or extracellular depolymerization products accumulate as soil dries? *Soil Biol Biochem* **98**: 54–63
- Warren, C.R.** (2014) Response of osmolytes in soil to drying and rewetting. *Soil Biol Biochem* **70**: 22–32
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., und Schwede, T.** (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* **46**: W296–W303
- Webb, B.A., Karl Compton, K., Castañeda Saldaña, R., Arapov, T.D., Keith Ray, W., Helm, R.F., und Scharf, B.E.** (2017) *Sinorhizobium meliloti* chemotaxis to quaternary ammonium compounds is mediated by the chemoreceptor McpX. *Mol Microbiol* **103**: 333–346
- Welsh, D.T.** (2000) Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 263–290
- Weretilnyk, E.A., und Hanson, A.D.** (1989) Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: purification, in vitro translation of the mRNA, and regulation by salinity. *Arch Biochem Biophys* **271**: 56–63

- Weretilnyk, E.A., und Hanson, A.D.** (1990) Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 2745–2749
- Wilking, J.N., Zaburdaev, V., Volder, M. De, Losick, R., Brenner, M.P., und Weitz, D.A.** (2013) Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 848–852
- Wilkinson, S.P., und Grove, A.** (2004) HucR, a novel uric acid-responsive member of the MarR family of transcriptional regulators from *Deinococcus radiodurans*. *J Biol Chem* **279**: 51442–51450
- Wilkinson, S.P., und Grove, A.** (2006) Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. *Curr Issues Mol Biol* **8**: 51–62
- Winkelman, J.T., Blair, K.M., und Kearns, D.B.** (2009) RemA (Ylza) and RemB (YaaB) regulate extracellular matrix operon expression and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **191**: 3981–3991
- Winkelman, J.T., Bree, A.C., Bate, A.R., Eichenberger, P., Gourse, R.L., und Kearns, D.B.** (2013) RemA is a DNA-binding protein that activates biofilm matrix gene expression in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **88**: 984–997
- Woese, C.R., Kandler, O., und Wheelis, M.L.** (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4576–4579
- Wolters, J.C., Berntsson, R.P.-A., Gul, N., Karasawa, A., Thunnissen, A.-M.W.H., Slotboom, D.-J., und Poolman, B.** (2010) Ligand binding and crystal structures of the substrate-binding domain of the ABC transporter OpuA. *PLoS One* **5**: e10361
- Wood, J.M.** (1999) Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 230–262
- Wood, J.M.** (2011) Bacterial osmoregulation: a paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annu Rev Microbiol* **65**: 215–238
- Wood, J.M., Bremer, E., Csonka, L.N., Kraemer, R., Poolman, B., van der Heide, T., und Smith, L.T.** (2001) Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **130**: 437–460
- Xia, X., Wu, S., Li, L., Xu, B., und Wang, G.** (2018) The cytochrome *bd* complex is essential for chromate and sulfide resistance and is regulated by a GbsR-type regulator, CydE, in *Alishewanella* sp. WH16-1. *Front Microbiol* **9**: doi:10.3389/fmicb.2018.01849
- Yan, J., Nadell, C.D., Stone, H.A., Wingreen, N.S., und Bassler, B.L.** (2017) Extracellular-matrix-mediated osmotic pressure drives *Vibrio cholerae* biofilm expansion and cheater exclusion. *Nat Commun* **8**: 327
- Yancey, P.H.** (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol* **208**: 2819–2830
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., und Somero, G.N.** (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214–1222
- Yoshida, M., Hiromoto, T., Hosokawa, K., Yamaguchi, H., und Fujiwara, S.** (2007) Ligand specificity of MobR, a transcriptional regulator for the 3-hydroxybenzoate hydroxylase gene of *Comamonas testosteroni* KH122-3s. *Biochem Biophys Res Commun* **362**: 275–280

- Zárate-Romero, A., Murillo-Melo, D.S., Mújica-Jiménez, C., Montiel, C., und Muñoz-Clares, R.A.** (2016) Reversible, partial inactivation of plant betaine aldehyde dehydrogenase by betaine aldehyde: mechanism and possible physiological implications. *Biochem J* **473**: 873–885
- Zhao, F.-J.** (2016) A novel pathway of arsenate detoxification. *Mol Microbiol* **100**: 928–930
- Zhu, Y.-G., Xue, X.-M., Kappler, A., Rosen, B.P., und Meharg, A.A.** (2017) Linking genes to microbial biogeochemical cycling: lessons from arsenic. *Environ Sci Technol* **51**: 7326–7339
- Ziegler, C., Bremer, E., und Krämer, R.** (2010) The BCCT family of carriers: from physiology to crystal structure. *Mol Microbiol* **78**:13-43

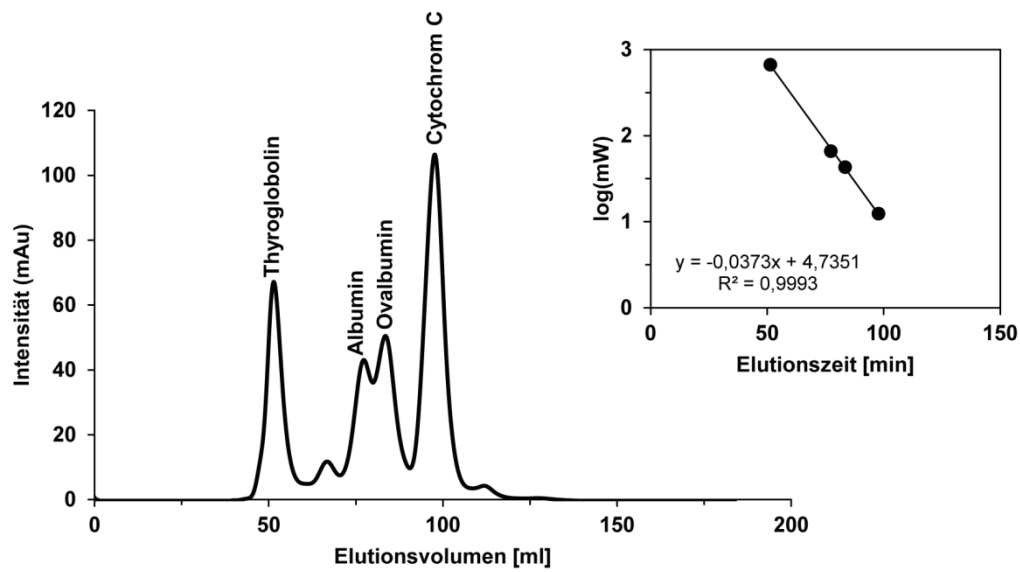
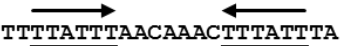
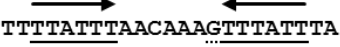
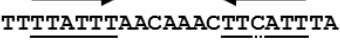
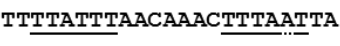
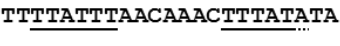
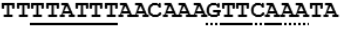


Abbildung 49 Größenausschlusschromatographie der Referenzproteine.

Für die Gelfiltrationsläufe wurde die Gelfiltrationssäule HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare, München) mit einem Puffer aus 100 mM KPP (pH 8) und 300 mM NaCl verednet. Die Kalibrierung der Säule erfolgte mit Thyroglobulin (667 kDa), Rinderserum Albumin (66 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Cytochrom C eines Pferdeherzens (12,4 kDa) als Referenzproteine. Die Referenzproteine wurden in einer Konzentration von jeweils 2 mg ml^{-1} eingesetzt.

Tabelle 11 Analyse der GbsR-Bindestelle nach Nau-Wagner *et al.* (2012).

Die Vorhergesagte GbsR-Bindestelle innerhalb der *gbsAB* Promotorregion (Nau-Wagner *et al.*, 2012) ist durch Pfeile gekennzeichnet und unterstrichen. Mutationen innerhalb dieser Region wurden durch gepunktete Linien markiert. *B. subtilis* Stämme, die eine chromosomale Kopie der dargestellten *gbsA-treA* Reporterfusion trugen, wurden in SMM bis zu einer OD₅₇₈ von 0,25 kultiviert. Aliquots dieser Kulturen wurden für die Bestimmung der TreA-Aktivität verwendet. Zu diesem Zeitpunkt wurden NaCl (Endkonzentration von 0,4 M) und Cholin (Endkonzentration 1 mM) zu den Kulturen hinzugefügt. Nach einer weiteren Inkubation für 90 Minuten wurden Aliquots der Kulturen durch Zentrifugation geerntet und auf ihre TreA-Aktivität untersucht.

Promotorregion Φ(<i>gbsA-treA</i>)	Stamm	<i>gbsR</i>	TreA-Aktivität [U (mg Protein) ⁻¹]	
			SMM	SMM 0,4 M NaCl + 1 mM Cho
 TTTTATTTAACAACCTTTATTTA	DHB4	+	4 ± 1	110 ± 2
	DHB12	-	137 ± 4	153 ± 15
 TTTTATTTAACAAGTTTATTTA	AROB9	+	4 ± 2	99 ± 3
	AROB4	-	113 ± 15	151 ± 5
 TTTTATTTAACAACCTTCATTTA	TMB128	+	6 ± 0	122 ± 8
	TMB131	-	126 ± 23	171 ± 21
 TTTTATTTAACAACCTTTAATTA	TMB129	+	4 ± 1	112 ± 22
	TMB132	-	149 ± 11	181 ± 12
 TTTTATTTAACAACCTTTATATA	TMB130	+	9 ± 1	161 ± 21
	TMB133	-	103 ± 5	129 ± 12
 TTTTATTTAACAAGTTCAAATA	AROB10	+	7 ± 2	105 ± 4
	AROB5	-	145 ± 27	161 ± 14

	50	60	70	80	90	100	110
<i>Bacillus subtilis subtilis</i> 168	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus murimartini</i> LMG21005	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus sp.</i> BS34A	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus subtilis subtilis</i> NCIB 3610	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus sp.</i> YP1	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus sp.</i> CMAA 1185	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus sp.</i> JS	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus sp.</i> A053	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus subtilis spizizenii</i> ATCC 6633	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus tequilensis</i> KCTC 13622	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus vallismortis</i> DV1-F-3	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus sp.</i> MSP13	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus malacitensis</i> NRRL B-41618	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus mojavensis</i> RO-H-1	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus sp.</i> 5B6	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus velezensis</i> SB1216	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus sp.</i> Co1-6	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus sp.</i> LK7	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus methylotrophicus</i> SK19.001	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus sp.</i> BH072	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus vanillea</i> XY18	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus sp.</i> SDL11	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus sp.</i> JFL15	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Campbell F, DSM 7	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus nakamurai</i> NRRL B-41091	SDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus sonorensis</i> L12	SDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus glycinifermentans</i> TH008	SDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM13 Göttingen	SDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus sp.</i> BT1B CT2	SDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus sp.</i> MSP5.4	SDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus sp.</i> SB47	SDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus paralichiniformis</i> KJ-16	SDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus sp.</i> NSP9.1	NEE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDMNIVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus pumilus</i> B6033	NEE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDMNIVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus sp.</i> TH007	NEE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDMNIVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus aerophilus</i> C772	NEE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDMNIVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus invictae</i> DSM 26896	NEE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDMNIVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b	NEE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDMNIVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus sp.</i> RRD69	NEE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDMNIVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus sp.</i> LK10	NEE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDMNIVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus xiamensis</i> VV3	NEE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDMNIVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus zhangzhouensis</i> DW5-4	NEE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDMNIVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus sp.</i> WP8	NEE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDMNIVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus safensis</i> CFA06	NEE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDMNIVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus australimaris</i> NH71.1	NEE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDMNIVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus aidingsensis</i> DSM 18341	EOD	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQEFNVVKKTFHRG	IRKHTFVAEKDFFKFFTNFFPPKWEREV				
<i>Bacillus endophyticus</i> 2102	END	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQELDIVKKTFIKGSRKHTYVAEKDFFHFFANFFTHKWERE					
<i>Bacillus sp.</i> REN51N	END	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQELDIVKKTFIKGSRKHTYVAEKDFFHFFANFFTHKWERE					
<i>Bacillus filamentosus</i> SGO-14	END	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQELDIVKKTFIKGSRKHTYVAEKDFFHFFANFFTHKWERE					
<i>Bacillus cytotoxicus</i> CVUAS 2833	EDD	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDFDIVKKTFIKGSRKHTYVAEKDFFKFFTNFFSHKWERE					
<i>Bacillus okhensis</i> Kh-10-101T	KQQ	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQEIEMVKKTFTRGSRKHTYVAEKDFFRSFMAFYQCMWERE					
<i>Bacillus salinus</i> IBRC-M100078	KDQ	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQEIEMVKKTFTRGSRKHTYVAEKDFFRSFMAFYQCMWERE					
<i>Bacillus massiliosenegalensis</i> JC63	KEQ	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQEIEMVKKTFTRGSRKHTYVAEKDFFRSFMAFYQCMWERE					
<i>Bacillus sp.</i> ES.036	KDQ	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQEIEMVKKTFTRGSRKHTYVAEKDFFRSFMAFYQCMWERE					
<i>Bacillus macauensis</i> ZHFKF-1	SGP	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQEIEMVKKTFTRGSRKHTYVAEKDFFRSFMAFYQCMWERE					
<i>Bacillus sp.</i> FJAT-14515	KQHP	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQEIEMVKKTFTRGSRKHTYVAEKDFFRSFMAFYQCMWERE					
<i>Bacillus sp.</i> IHB B 7164	MDEP	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQEIEMVKKTFTRGSRKHTYVAEKDFFRSFMAFYQCMWERE					
<i>Bacillus megaterium</i> DSM319	MDEP	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQEIEMVKKTFTRGSRKHTYVAEKDFFRSFMAFYQCMWERE					
<i>Bacillus sp.</i> T61	MDEP	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQEIEMVKKTFTRGSRKHTYVAEKDFFRSFMAFYQCMWERE					
<i>Bacillus sp.</i> RP1137	MDEP	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQEIEMVKKTFTRGSRKHTYVAEKDFFRSFMAFYQCMWERE					
<i>Bacillus sp.</i> FJAT-14515	SED	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQEIEMVKKTFTRGSRKHTYVAEKDFFRSFMAFYQCMWERE					
<i>Bacillus ionarensis</i> 25ng	HDP	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQEIEMVKKTFTRGSRKHTYVAEKDFFRSFMAFYQCMWERE					
<i>Bacillus lehensis</i> G1	SDD	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQEIEMVKKTFTRGSRKHTYVAEKDFFRSFMAFYQCMWERE					
<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16	NDG	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQEIEMVKKTFTRGSRKHTYVAEKDFFRSFMAFYQCMWERE					

Abbildung 50 Sequenzvergleich der GbsR Proteine der Gattung *Bacillus*

Unter Verwendung des MAFFT Servers (Kato et al., 2017) wurden die Sequenzen der 68 GbsR Proteine, die innerhalb der Gattung *Bacillus* identifiziert wurden, mit der Aminosäuresequenz von GbsR aus *B. subtilis* (Nau-Wagner et al., 2012) verglichen. Dargestellt ist nur die N-terminale Domäne der Proteine, die das Helix-Turn-Helix Motiv (grün), den flexiblen Linker (rot) und die putative Ligandenbindetasche beinhaltet. Konservierte Aminosäuren sind grau hinterlegt.

	50	60	70	80	90	100	110
<i>Bacillus subtilis subtilis</i> 168	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRRGIRKHTFVAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus</i> sp. JS	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRRGIRKHTFVAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus subtilis spizizenii</i> TU-B-10 DSM 15029	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRRGIRKHTFVAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus athrophaeus</i> 1942	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRRGIRKHTFVAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SQR9	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRRGIRKHTFVAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus methylotrophicus</i> JJ-D34	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRRGIRKHTFVAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7	RDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRRGIRKHTFVAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	SDE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDLNVVKKTFHRRGIRKHTFVAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	NEE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDMNIVKKTFRGRRKHSFVAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus pumilus</i> B6033	NEE	MTLDEMREELQMSKPSMSTGVKKLQDMNIVKKTFRGRRKHSFVAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus selenitireducens</i> MLS10	KDQ	MTLDEMREELQMSKPSMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Halobacillus halophilus</i> DSM 2266	EDQ	MNLDDEMREELQMSKPSMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Tetragenococcus halophilus</i> NBRC 12172	EDS	MTLDEMREELQMSKPSMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Staphylococcus saprophyticus saprophyticus</i> ATCC 15305	EDS	MTLDEMREELQMSKPSMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Staphylococcus xylosus</i> HKUOPL8	EDS	MTLDEMREELQMSKPSMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Staphylococcus aureus aureus</i> ATCC 25923	EGS	MTLDEMREELQMSKPSMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	EGS	MTLDEMREELQMSKPSMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Staphylococcus warneri</i> SG1	EGS	MTLDEMREELQMSKPSMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Staphylococcus pasteurii</i> SP1	EGS	MTLDEMREELQMSKPSMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> JCSC1435	EGS	MTLDEMREELQMSKPSMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Staphylococcus carnosus carnosus</i> TM300	EDN	MTLDEMREELQMSKPSMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Staphylococcus lugdunensis</i> HKU09-01	EGS	MTLDEMREELQMSKPSMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> HKU10-03	KES	MTLDEMREELQMSKPSMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Virgibacillus</i> sp. SK37	KHEP	ITLDEMREELQMSKPSMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus megaterium</i> DSM 319	MDEP	VTLDQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus lehensis</i> G1	SDDP	MNLDQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16	NDGP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus athrophaeus</i> 1942	NRKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus subtilis subtilis</i> 168	NRKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus</i> sp. JS	NRKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus subtilis spizizenii</i> TU-B-10 DSM 15029	NRKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SQR9	NRKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus methylotrophicus</i> JJ-D34	NRKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7	NRKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus athrophaeus</i> 1942	NRKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus subtilis subtilis</i> 168	NRKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus</i> sp. JS	NRKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus subtilis spizizenii</i> TU-B-10 DSM 15029	NRKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SQR9	NRKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus methylotrophicus</i> JJ-D34	NRKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7	NRKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	NRKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	NRKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus pumilus</i> B6033	NRKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus coagulans</i> 2-6	NHRP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Virgibacillus</i> sp. SK37	NRT	PMTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus lehensis</i> G1	NRO	AMTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Desulfotomaculum reducens</i> MI-1	QDKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Geobacillus</i> sp. Y412MC10	ADKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Paenibacillus lactis</i> 154	ADKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Paenibacillus polymyxa</i> M1	ADKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Paenibacillus terrae</i> HPL-003	SDHP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Paenibacillus alvei</i> DSM 29	NGQP	VTLDQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Paenibacillus sabiniae</i> T27	HNGP	VTLDQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Thermobacillus composti</i> KWC4 DSM 18247	QNDP	ITLDQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2	SDGP	VTLDQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Paenibacillus larvae larvae</i> 08-100 DSM 25719	ENKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus infantis</i> NRRL B-14911	ENKP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus selenitireducens</i> MLS10	SKDP	MTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus cellulosilyticus</i> DSM 2522	AE	PMTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus lehensis</i> G1	EE	NALTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16	EN	DTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Virgibacillus</i> sp. SK37	ADD	PLTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Halobacillus halophilus</i> DSM 2266	HP	HPMTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					
<i>Alkaliphilus oremlandii</i> OhLas	EN	NPLTLDELQMSSEALGMSKPTMSTSVRRKLEIDMVKKTFTRGSRKHTYIAEKDFKFFFTNFFPPKWEREV					

Abbildung 51 Sequenzvergleich der GbsR-Typ Proteine, die mit osmotischem Stress assoziiert sind.

Die Sequenzen der 65 GbsR-Typ Proteine, die mit Anpassungsmechanismen für osmotischen Stress assoziiert sind, wurden unter Verwendung des MAFFT Servers (Katoh *et al.*, 2017) mit der Aminosäuresequenz von GbsR aus *B. subtilis* (Nau-Wagner *et al.*, 2012) verglichen. Die GbsR-Typ Proteine wurden auf Basis der angrenzenden Gene farblich markiert. Befinden sich angrenzend an das *gbsR*-Typ Gen Glycinebetain Synthese Gene ist diese Markierung rot. OpuAR-Typ Proteine wurden blau markiert. GbsR Homologe, die mit OpuB-Typ Transportern assoziiert sind haben eine grüne Markierung und solche, die mit einem Transporter des OpuC-Typs assoziiert sind eine gelbe. Dargestellt ist die N-terminale Domäne der Proteine, die das Helix-Turn-Helix Motiv (grün), den flexiblen Linker (rot) und die putative Ligandenbindetasche des GbsR Proteins beinhaltet. Konservierte Aminosäuren sind grau hinterlegt.

Abbildung 52 Sequenzvergleich der GbsR-Typ Proteine, die nicht mit osmotischem Stress assoziiert sind. Die Sequenzen der 114 GbsR-Typ Proteine, die nicht mit Anpassungsmechanismen für osmotischen Stress assoziiert sind, wurden unter Verwendung des MAFFT Servers (Katoh *et al.*, 2017) mit der Aminosäuresequenz von GbsR aus *B. subtilis* (Nau-Wagner *et al.*, 2012) verglichen. CydE-Typ Proteine (Xia *et al.*, 2018) wurden schwarz markiert. GbsR Homologe, die mit Transportern assoziiert vorliegen, die nicht einem OpuA, OpuB oder OpuC-Type Transporter entsprechen, wurden pink markiert. Hell violette Boxen markieren GbsR-Typ Proteine, deren genetische Umgebung keinen Rückschluss auf eine mögliche Funktion zulässt. Die N-terminale Domäne der Proteine, die das Helix-Turn-Helix Motiv (grün), den flexiblen Linker (rot) und die putative Ligandenbindetasche des GbsR Proteins beinhaltet ist dargestellt. Konservierte Aminosäuren sind grau hinterlegt.

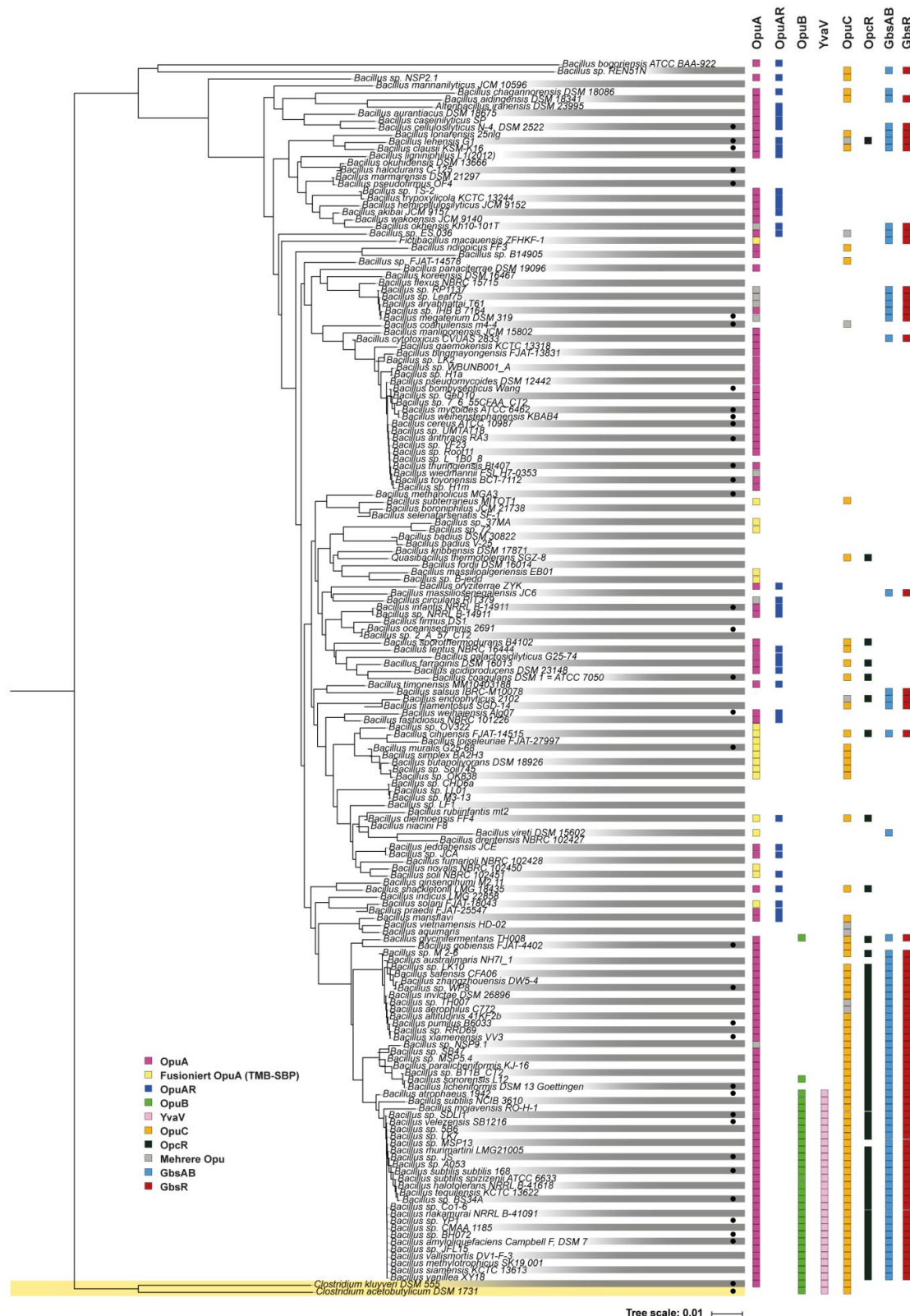


Abbildung 53 Phylogenetische Verbreitung der GbsR-Typ Regulatoren innerhalb der Gattung *Bacillus*.

175 Stämme der Gattung *Bacillus*, für die 16S rDNA Daten in der SILVA Datenbank (Glöckner *et al.*, 2017) hinterlegt waren wurden mit Hilfe der IMG/M Datenbank (Chen *et al.*, 2017a) identifiziert. Dabei wurde die Suche auf einen Stamm pro Spezies beschränkt. Der phylogenetische Stammbaum wurde auf Basis von 16S rDNA Informationen konstruiert. Als „Outgroup“ dienten zwei Stämme der Gattung *Clostridium* (gelb). Vertreter mit vollständig sequenziertem Genom sind durch einen schwarzen Punkt markiert. GbsR Homologe wurden unter Verwendung der Aminosäuresequenz des GbsR Proteins aus *B. subtilis* (Nau-Wagner *et al.*, 2012) mit Hilfe einer BLAST Suche (Altschul *et al.*, 1990) identifiziert. Ihre Gruppierung erfolgte anhand der genetischen Umgebung mit Hilfe des „neighborhood Tools“ des JGI Webserver (Chen *et al.*, 2017a).

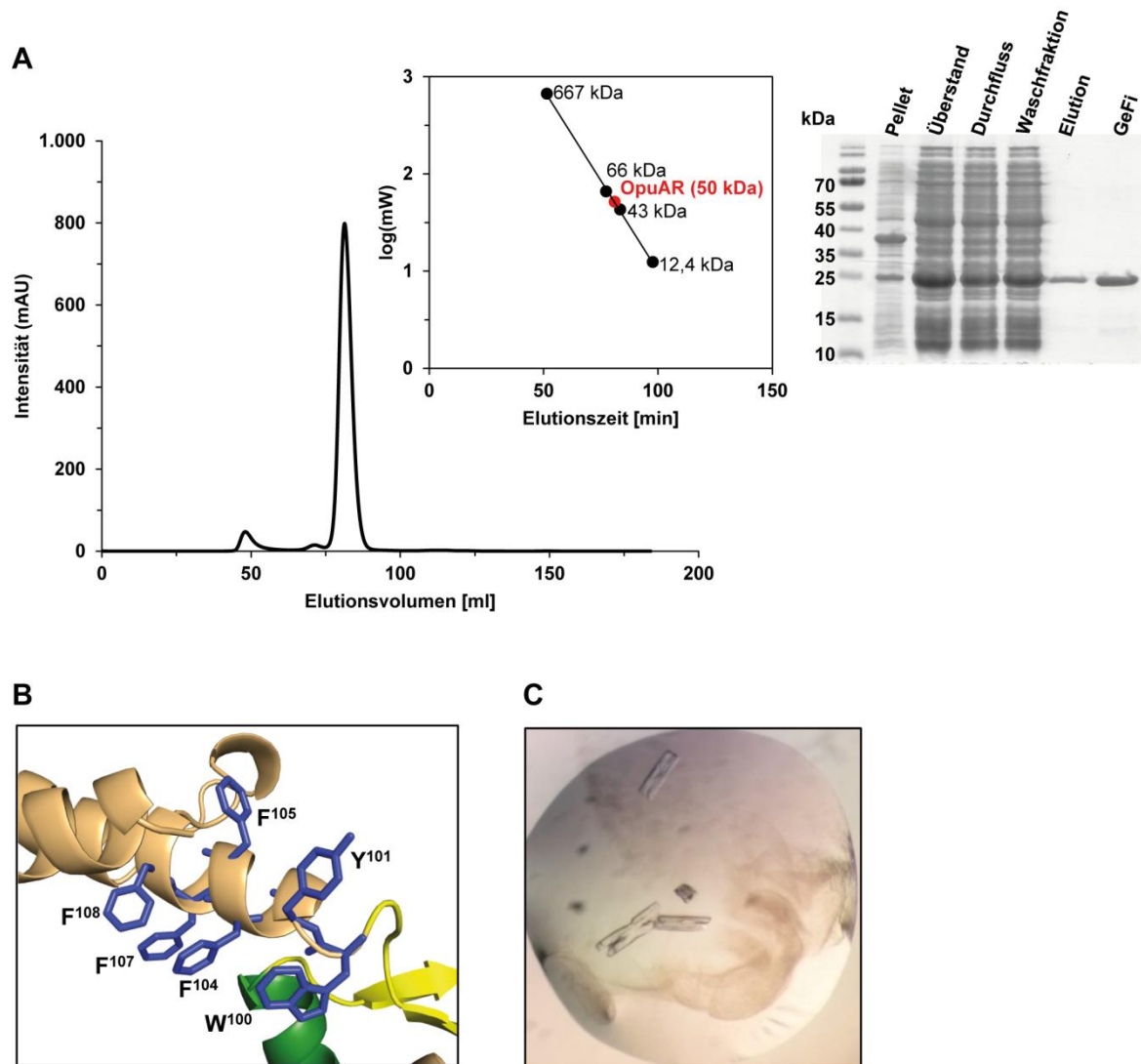


Abbildung 54 Kristallisation des OpuAR Proteins aus *P. lautus*.

(A) Unmittelbar nach der Reinigung des OpuAR Proteins wurden 2 ml der Proteinlösung (11 mg ml^{-1}) auf eine Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg) aufgetragen. Der verwendete Puffer enthielt 100 mM KPP (pH 8) und 300 mM NaCl. Für die Kalibrierung der Säule wurden Thyroglobulin (667 kDa), Rinderserum Albumin (66 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Cytochrom C eines Pferdeherzens (12,4 kDa) als Referenzproteine verwendet. Die Reinheit, sowie die Molekularmasse von OpuAR wurden im Anschluss an die Aufreinigung (Elution) und die Größenausschlusschromatographie (GeFi) mittels SDS-Gel (15%) analysiert. (B) *In silico* Model der putativen OpuAR Ligandenbindebox auf Basis des DNA-bindenden Proteins Mj223 aus *M. jannaschii* [PDB 1KU9 (Ray *et al.*, 2003)]. Das Helix-Turn-Helix Motiv des DNA-Lesekopfs (grün), der flexible Linker (gelb) und die putative Ligandenbindetasche (blau) sind farblich gekennzeichnet. (C) Proteinkristalle von OpuAR. Die Kristallisation erfolgte in einer Lösung aus 0,2 M KH_2PO_4 und 20% PEG 3350 im „hangig drop“ Verfahren. Eingesetzt wurde 1 μl einer OpuAR Lösung (15 mg ml^{-1}). Kristalle zeigten sich nach einem Zeitraum von 24 Stunden.

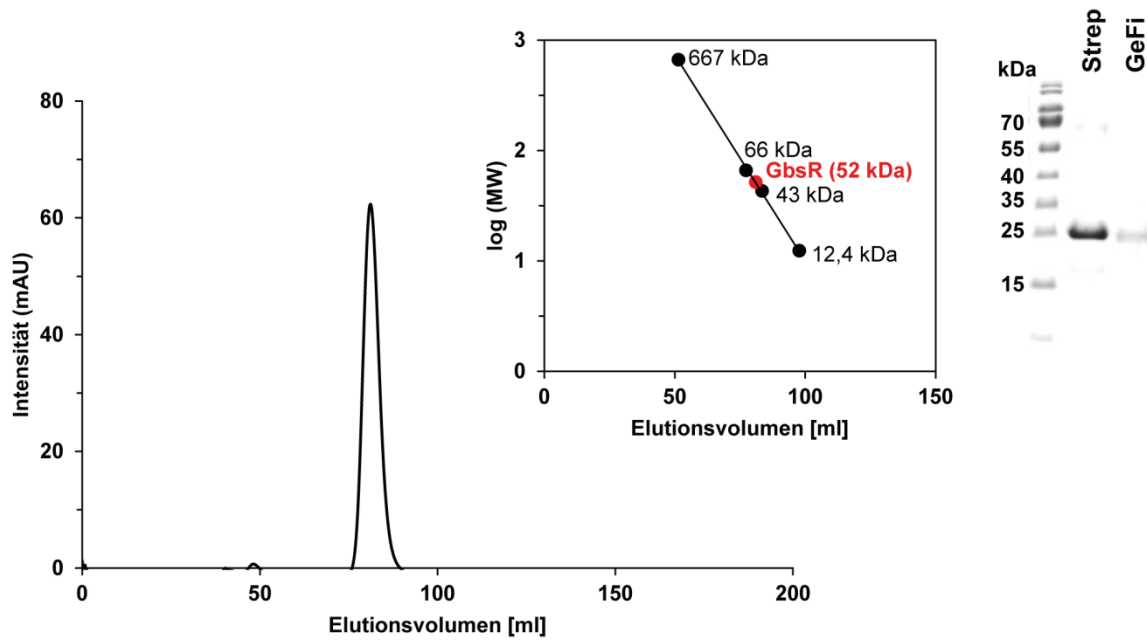


Abbildung 55 Größenausschlusschromatographie des GbsR⁸³G/D Proteins aus *B. subtilis* und seine Analyse mittels SDS-Gel.

Unmittelbar nach der Reinigung des GbsR_D⁸³ Proteins wurden 2 ml der Proteinlösung (1,1 mg ml⁻¹) auf eine Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg) aufgetragen. Der verwendete Puffer enthielt 100 mM KPP (pH 8) und 300 mM NaCl. Für die Kalibrierung der Säule wurden Thyroglobulin (667 kDa), Rinderserum Albumin (66 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Cytochrom C eines Pferdeherzens (12,4 kDa) als Referenzproteine verwendet. Die Reinheit, sowie die Molekularmasse von GbsR_G⁸³ wurden im Anschluss an die Größenausschlusschromatographie mittels SDS-Gel (15%) analysiert

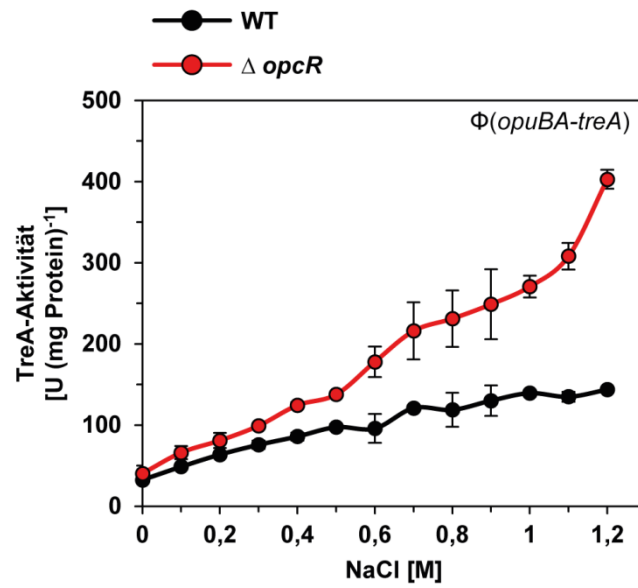


Abbildung 56 Repression der *opuB* Expression durch OpcR in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration des Mediums.

Die *opuBA-treA* Reporterstämme STHB49 (WT) und STHB51 ($\Delta opcR$) wurden in SMM mit den angegebenen NaCl Konzentrationen bis zum Erreichen der OD_{578} 1-1,5 kultiviert und für die Bestimmung der TreA-Aktivität geerntet.

A

cacAGCTGATCATCCCTTCAAATGGCAATTGATGGTGTC**AATATA**TCATATTTCTTCCTGGTGT**TGAAAA**TAGC**TGAA**
opcRBS-I
BS-IIBS-IIIBS-IVBS-VBS-VI
 TGCAGAGGAAGTGGGAGGTATCCGGAGTAATTGTAA**GAACACCCT**TT**CCGT**CTCGGTCATAACAATAAATAATCTATA
 AATAACATATAATTTCAACACATTGTAAAC**TTTTTA**TTTACAAAGTTCAAAC**TATAAT**AAGGATT**A**TACTTTTCAGA
 AAATTTAAAGGAAACCTGCGGAGGTGCACGGAttg
-35-10
opuCA

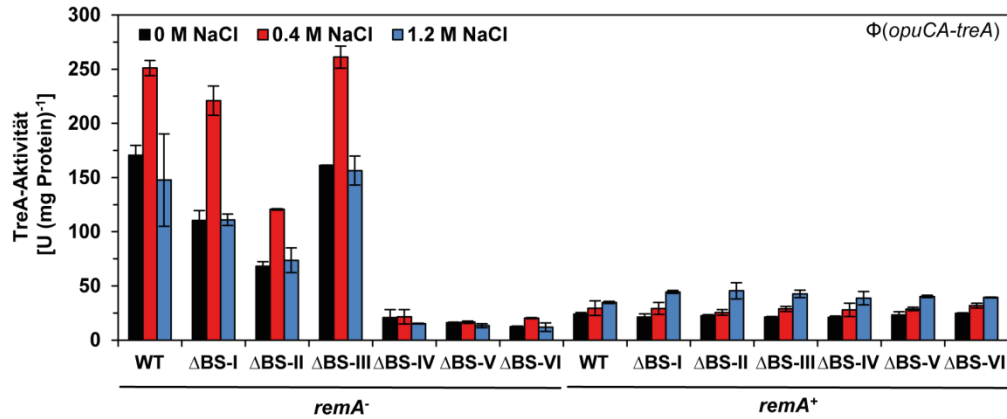
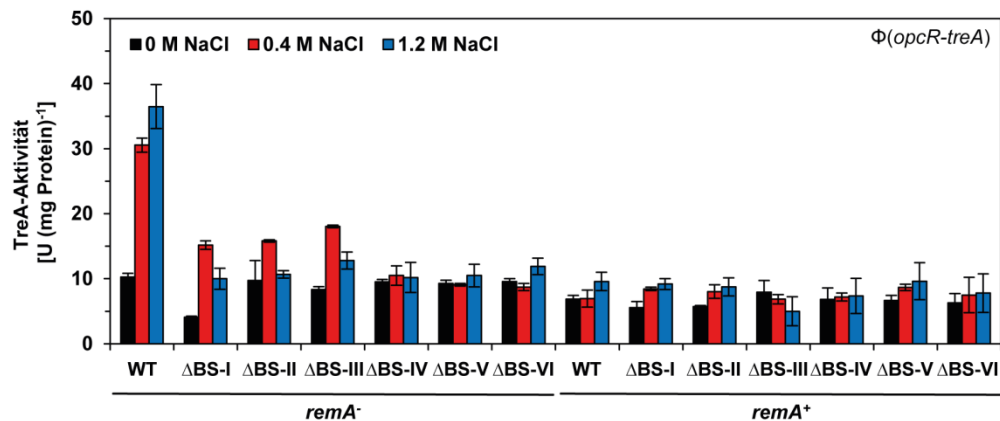
B**C**

Abbildung 57 RemA-Bindestellen im intergenen Bereich des *opuC* Operons und des *opcR* Gens in *B. subtilis*.

(A) Darstellung der DNA Sequenz des intergenen Bereichs des *opuC* Operons und des *opcR* Gens. Die vorhergesagten -10 und -35 Elemente der SigA Promotoren (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013) sind eingezeichnet. Die einzelnen RemA-Bindestellen (Winkelman und Kearns, unveröffentlichte Daten) sind orange markiert. (B) *opuCA-treA* und (C) *opcR-treA* Reportergerätsstämme mit Deletionen der individuellen RemA-Bindestellen wurden in SMM, SMM mit 0,4 M NaCl und SMM mit 1,2 M NaCl inkubiert. Bei Erreichen einer OD₅₇₈ von 1-1,5 wurden Aliquots der Kulturen durch Zentrifugation geerntet und für die Bestimmung der TreA-Aktivität verwendet.

IX. Danksagung

Als allererstes gilt mein Dank **Herrn Prof. Dr. Bremer**. Danke für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen, für stete Diskussionsbereitschaft, viele Ratschläge, viel Vertrauen und dafür, dass sie mich davon überzeugt haben mich mit Proteinen auseinander zu setzen.

Ich danke **Herrn Prof. Dr. Gert Bange** zum einen für die Bereitschaft als Zweitgutachter dieser Arbeit zu fungieren und zum anderen für eine tolle Kooperation um endlich eine Kristallstruktur von GbsR und seinen Freunden zu erhalten.

Danke auch an **Prof. Dr. Martin Thanbichler** und **Prof. Dr. Knut Drescher**, die mich im Rahmen meiner TAC Meetings unterstützt haben. In diesem Zusammenhang möchte ich auch der **IMPRS** für die Förderung und Finanzierung meiner Doktorarbeit danken.

Ein großer Dank gilt auch meinen Kooperationspartnern **Dr. Sven-Andreas Freibert**, **Nils Mais** und **Prof. Dr. Andreas Seubert**, ohne die viele Experimente nicht möglich gewesen wären, sowie **Oliver Czech**, für die super Unterstützung in NMR-Fragen. Danke auch an die „**Greifswälder**“ (Uwe Völker, Ulrike Mäder und Hermann Rath) für die vielen Diskussionen am Rande diverser Konferenzen.

Danke **Jutti** und **Daniela**, ihr habt mich immer gerettet wenn ich mal wieder tausende Kölbchen vor mir hatte und nicht mehr wusste wo mir der Kopf stand. Danke auch an **Jochen** für unzählige Produktionen der verschiedenen GbsR-Typ Proteine und die Erkenntnis, dass Proteine auch Spaß machen können.

Ich möchte an dieser Stelle allen **Bremerlingen** (Tamara, Doreen, Alex, Christine, Sarah, Anita, Laura T., Nelli & Svenja) und auch **Heiderlingen** für die tolle Arbeitsatmosphäre, viele Ratschläge, aufmunternde Worte und viel Spaß bei der Arbeit danken. Ganz besonders muss ich **Laura C.** und **Lucas** danken. Eine Tasse Kaffee mit euch hat häufig Problemlösungen und neue Ideen hervorgebracht, für etwas Ruhe im Chaos gesorgt oder mich einfach nur zum Lachen gebracht. Vielen Dank dafür.

Danke an meine drei Bachelorstudenten **Marianne Fischer**, **Daniel Rode** und **Lucas Schnabel**, euch zu betreuen war eine tolle Erfahrung.

Der allergrößte Dank gilt aber **meinen Eltern**. Ihr seid immer für mich da und glaubt an mich, egal was ich mir in den Kopf setze. Ohne eure Unterstützung wäre diese Arbeit vermutlich nie entstanden!

X. Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Regulation der Aufnahme und Synthese des kompatiblen Soluts Glycinbetain durch GbsR-Typ Regulatoren

Selbstständig verfasst, keine anderen als die im Text angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die um Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszweck gedient.

Es wurde von mir bisher noch keine Dissertation versucht.

Bianca Warmbold

Ort, Datum